

th 2000 0140

50376
1999
487



THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET DES TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'USTL
SPECIALITE : MICROBIOLOGIE



par

Sébastien GUYARD

EXPLORATION DU MONDE MICROBIEN DES EAUX MINERALES NATURELLES DE SAINT AMAND

soutenue le 1^{er} février 1999 devant la commission d'examen composée de :

- | | |
|--|-------------|
| Mr. R. Tailliez (Professeur - Lille1) | Président |
| Mrs H. Leclerc (Professeur - Lille2)
M.S. Da Costa (Professeur - Portugal) | Rapporteurs |
| Mrs J.-P. Hornez (Professeur - Lille 1)
C. Defives (Maître de conférence - Lille1)
F. Chantraine (Directeur de la S ^{té} des EMN de S ^t Amand) | Examineurs |
| Mlle F. Gavini (Chargée de recherche - l'INSERM) | |

L'homme est absurde par ce qu'il cherche, grand par ce qu'il trouve.

Paul Valéry (1871-1945)

A Valou, ma femme.

*A mes parents et beaux
parents, en gage de mon
affection et de ma
reconnaissance.*

*A mes sœurs et les pièces
rapportées pour votre
présence, même lointaine.*

L'appétit de savoir naît du doute. Cesse de croire et
instruis-toi.
André Gide (1869-1951)

Ce travail est effectué au Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille 1.

Mes remerciements

à Monsieur le Professeur H. LECLERC, pour l'honneur qu'il me fait de participer à ce jury. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus sincères et ma profonde admiration pour ses innombrables travaux scientifiques relatifs aux eaux minérales.

à Monsieur le Professeur M.S. DA COSTA pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et participer à ce jury. Je lui exprime ma profonde reconnaissance.

à Messieurs le Docteur Patrice MARY, le Docteur Claude DEFIVES et au Professeur Jean-Pierre HORNEZ qui ont constitué mon équipe scientifique au cours de cette thèse. Je remercie tout particulièrement P. MARY pour sa patience, son incommensurable soutien scientifique et ses connaissances bibliographiques qui m'ont permis de venir à bout de posters, de publications et de ce manuscrit.

à Messieurs Francis CHANTRAINE, Président de la Société des Eaux Minérales de Saint Amand et François BOUTON, Responsable Qualité, pour leur soutien moral mais surtout pour leur dynamisme et leur foi en la recherche lesquels ont été les précurseurs de ce travail et mes moteurs de motivation.

à Madame le Docteur Françoise GAVINI, pour sa disponibilité, sa pédagogie, ses commentaires sur l'écologie, ainsi que pour m'avoir fourni des souches de référence. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus chaleureux.

Mes remerciements vont également

A Madame GALLO, Mademoiselle HANI et MEMBRE, Messieurs BRUNET, BECHET, CARON, DELATTRE et MUCHEMBLED pour leur écoute, leurs collaborations techniques et scientifiques ainsi que pour les excellents moments de détente passés en leur compagnie.

L'appétit de savoir naît du doute. Cesse de croire et instruis-toi.
André Gide (1869-1951)

L'ensemble des travaux menés aux laboratoires à fait l'objet des publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES (avec comité de lecture) :

1- Enumeration and characterization of bacteria isolated from mineral water by improved direct viable count method.

Guyard, S., Mary, P., Defives, C. and Hornez, J.-P. Accepté dans *Journal of Applied Microbiology*.

2- Evolution of total counts, culturable and viable but non culturable microflora in a French mineral water : a case study.

Defives, C., **Guyard, S.**, Mary, P. and Hornez, J.-P. Accepté dans *Journal of Applied Microbiology*.

3- Intérêts de l'analyse des profils d'acides gras totaux dans l'étude des communautés bactériennes : Application aux populations bactériennes des eaux minérales.

Mary, P. **Guyard, S.**, Defives, C. et Hornez, J.-P. Accepté dans *Lebanese Research Reports*.

4- Isolation, characterization, identification and enumeration of microflora from two spring mineral waters in the "Nord/Pas-de-Calais" country (France).».

Guyard, S., Mary, P., Defives, C. and Hornez, J.-P. Soumis à *Water Research*.

POSTERS ET COLLOQUES :

1-Evolution du profil d'Acides Gras (A.G.) de *Pseudomonas fluorescens* en fonction de la phase physiologique et de la nature du milieu.

Guyard, S., Mary, P., Defives, C. and Hornez, J.-P. SFM, Lille 98'.

2-Evolution des profils d'acides gras totaux de *Pseudomonas fluorescens* MFO au cours de la croissance à différentes températures.

Mary, P., **Guyard, S.**, Defives, C. et Hornez, J.-P. SFM Lille 98'.

3-La microflore de l'eau minérale en microscopie électronique.

Defives, C., **Guyard, S.**, Mary, P. et Hornez, J.-P. EAU 50', Nancy 98.

4-Profils des A.G. totaux des microflores bactériennes des eaux minérales embouteillées.

Modification des A.G. de *Pseudomonas fluorescens* en conditions oligotrophiques.

Guyard, S., Mary, P., Defives, C. and Hornez, J.-P EAU 50', Nancy 98.

On ne peut rien dire de vrai sur rien. On ne peut penser quelque chose de vrai que si on n'y fait pas trop attention.

Jules Romains (1885-1972)

RESUME

Le monde microbien des eaux minérales est encore méconnu, avec des données éparses. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'efforcent à mettre en lumière son importance, ses caractères, sa nature dans deux sources « Vauban » et « Clos de l'Abbaye », de la Société des Eaux Minérales Naturelles de Saint Amand les Eaux (Nord). Plusieurs axes de recherche sont empruntés: (1) détermination de la nature des micro-organismes au sein des eaux du griffon et embouteillées, (2) identification et caractérisation de la microflore viable cultivable de ces eaux, (3) dénombrement et évolution des populations microbiennes dans ces différents environnements, (4) détermination de l'origine et étude de la niche écologique des bactéries viables cultivables isolées des forages et des bouteilles, (5) étude de la viabilité et cultivabilité de cette population microbienne aquicole et (6) analyse de l'implication sanitaire de la microflore des eaux minérales embouteillées via une étude sur la multirésistance de certaines bactéries et le suivi d'une contamination fécale dans le produit fini.

Ces divers travaux rendent compte de la complexité biologique du milieu et mettent l'accent sur l'intérêt d'entreprendre de sérieuses études sur ce précieux élément, pour comprendre et appréhender son monde microbien. Dans ce but, d'autres recherches portent sur de nouvelles méthodes d'investigations pour dénombrer, caractériser, suivre, contrôler la microflore des eaux minérales. Trois études sont entreprises. Les deux premières utilisent la microscopie à épifluorescence couplée à l'analyse d'image; l'une s'intéresse aux propriétés d'élongation spécifiques des micro-organismes selon leur profil de résistance aux (fluoro)quinolones, l'autre, aux colorants spécifiques, marqueurs de viabilité, de respiration et d'intégrité membranaire. Le troisième axe de recherche s'oriente avec l'aide d'une chromatographie phase-gaz couplée à un spectromètre de masse vers les acides gras bactériens, marqueurs de stabilité, de stress et caractères d'identification de la population bactérienne des eaux minérales.

L'eau minérale de Saint Amand de la Source du Clos de l'Abbaye est exploitée depuis 75 ans en tant qu'eau minérale - autorisation préfectorale du 8 Mars 1923 - et a été largement consommée sur les tables de plusieurs générations de gens du Nord. Par ailleurs, la Source Vauban fait déjà en 1714 l'objet d'un traité sur ses propriétés bénéfiques à la santé, attestant des bienfaits de cure qui remontent à l'époque celtique.

Il est évident que ses allégations sont basées sur des observations cliniques accumulées au fil des ans par les anciens, sans fondements véritablement scientifiques.

Une première approche analytique sur la minéralité au début du 20^{ème} siècle a permis de mieux connaître sa composition chimique. Si celle-ci varie d'une source à l'autre, pour une même source, elle présente une remarquable constante dans le temps.

« Les eaux de SAINT AMAND sont des eaux froides de minéralisation proche du gramme par litre, de type anionique mixte, sulfatées et bicarbonatées, à la fois calciques et magnésiennes »

Leur pureté bactériologique est attestée par de nombreuses analyses qui prouvent l'absence totale de germes pathogènes à l'émergence. C'est sur cet acquis que la Société des Eaux Minérales de Saint Amand a vécu depuis l'origine de son exploitation.

La Direction actuelle est parfaitement convaincue qu'aujourd'hui il est indispensable de dépasser le stade de la connaissance purement « légale » des eaux minérales et c'est dans cet esprit qu'elle a initié une thèse de 3^{ème} cycle sur la pureté exceptionnelle des eaux de Saint Amand.

Au-delà d'une simple connaissance plus approfondie de l'eau minérale de Saint Amand, la Direction de Saint Amand a voulu contribuer à travers ce travail scientifique à améliorer la connaissance de mécanismes encore peu étudiés sur les bactéries viables mais non cultivables ou l'identification de bactéries à partir des acides gras de leur membrane...

Je remercie sincèrement les professeurs Julliez et Honoré pour l'encadrement efficace de monsieur Sébastien Guyard tout au long de ce travail qui a permis la présentation des documents ci-après dont certains ont déjà fait l'objet de publication.

SOCIÉTÉ DES EAUX MINÉRALES DE SAINT-AMAND

Francis Chantraine,

Président et en préservant ses qualités.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Etude de la revivification des cellules viables non cultivables d'après McDouglad (1997).

Tableau 2 : Organismes colorés avec succès par le kit de viabilité Live/Dead® BacLight (Molecular Probe, L-7007, L-7012) (Haugland 1996).

Tableau 3 : Les acides gras communément rencontrés chez les bactéries d'après Busse *et al.* (1996).

Tableau 4 : Composition et quantité de carbone organique dissout (COD) des trois bouillons utilisés dans le test « Nutrient Tolerance » (NT).

Tableau 5 : Les souches types utilisées dans la classification.

Tableau 6 : Caractères biochimiques testés sur les isolats des eaux minérales embouteillées.

Tableau 7 : Antibiotiques (famille, nom, abréviation, quantité) et mode d'action.

Tableau 8 : Dénombrement de la microflore appartenant à deux eaux minérales françaises (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 9 : Identification de souches bactériennes représentatives et isolées à partir de deux eaux minérales à l'émergence (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 10 : Evolution de la population bactérienne totale libre et adsorbée dans les eaux minérales embouteillées (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 11 : Dénombrement et caractérisation de la communauté microbienne adsorbée sur les parois des bouteilles des deux eaux minérales commercialisées (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 12 : Identification des bactéries représentatives et isolées de deux eaux minérales embouteillées (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 13 : Caractéristiques et identification des bactéries isolées des eaux minérales de griffon (Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 14 : Caractéristiques et identification des bactéries isolées des eaux minérales embouteillées (Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 15 : Caractéristiques et identification des bactéries isolées des eaux minérales de griffon (Source Vauban).

Tableau 16 : Caractéristiques et identification des bactéries isolées des eaux minérales embouteillées (Source Vauban)

Tableau 17 : Distribution de la population bactérienne de quatre types d'eaux selon leurs caractères nutritifs.

Tableau 18 : Répartition des types trophiques au sein des classes nutritives définies pour 52 phénotypes isolées des eaux minérales Vauban et Source du Clos de l'Abbaye.

Tableau 19 : Liste de la classification basée sur 43 caractères biochimiques de souches isolées de deux eaux minérales à l'émergence et embouteillées (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 20 : Liste de classification basée sur 123 caractères biochimiques de souches isolées de deux eaux minérales à l'émergence et embouteillées (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 21 : Comparaison des classifications biochimiques (souches isolées des eaux embouteillées).

Tableau 22 : Comparaison des classifications biochimiques (souches isolées des forages).

Tableau 23 : Liste de la classification basée sur le profil d'acides gras des souches isolées de deux eaux minérales à l'émergence et embouteillées (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Tableau 24 : Caractérisation des groupes selon les acides gras discriminants.

Tableau 25 : Analyse des résultats de la classification basée sur les acides gras.

Tableau 26 : Détermination du nombre de bactéries viables et cultivables dans des bouteilles incubées pendant 5 jours à 20°C et additionnées de glucose, de chlorure d'ammonium (NH₄Cl), de peptone ou de sulfure de sodium (Na₂S).

Tableau 27 : Evolution des différents phénotypes des eaux minérales de Vauban (émergence et bouteille).

Tableau 28 : Dénombrement des cellules totales, viables, viables cultivables, viables non cultivables et mortes dans les eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye après 2 à 3 ans de stockage.

Tableau 29 : Dénombrement de la microflore viable cultivable sur R2A et PCA à 20°C et 37°C, juste après embouteillage de l'eau de la Source du Clos de l'Abbaye.

Tableau 30 : Troncature selon les sensibilités des isolats d'eau minérale naturelle.

Tableau 31 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des isolats d'eaux minérales.

Tableau 32 : Caractéristiques et identifications des isolats bactériens des eaux minérales à l'émergence (Source du clos de l'Abbaye et Source Vauban).

Tableau 33 : Comparaison de l'activité (CMI) *in vitro* de différentes quinolones et fluoroquinolones sur des bactéries isolées d'eaux minérales à l'émergence (Source du Clos de l'Abbaye et Vauban).

Tableau 34 : Détermination des caractéristiques géométriques moyennes des isolats des eaux minérales du griffon (Source du Clos de l'Abbaye et Vauban).

Tableau 35 : Modifications des caractéristiques géométriques moyennes de la souche Ev après 14 heures d'inhibition dans du Mueller Hinton en présence de différentes quinolones et fluoroquinolones.

Tableau 36 : Modification de l'hypoténuse moyenne de différentes souches au cours de l'incubation en Mueller Hinton avec les fluoroquinolones les plus effectives.

Tableau 37 : Dénombrement et caractérisation d'une souche parmi une communauté bactérienne dans du bouillon Mueller Hinton par la méthode DVC modifiée.

Tableau 38 : Dénombrement et caractérisation d'une souche parmi une communauté bactérienne d'eau minérale par la méthode DVC modifiée.

Tableau 39 : Identification des phénotypes isolés des eaux minérales embouteillées (Source Vauban).

Tableau 40 : Evolution des A.G. des phénotypes sous-dominants en eau minérale embouteillée (V2, V5 et V8) par rapport au phénotype dominant (V9) en fonction des conditions de culture. Comparaison d'*Oligella urethralis* V8 et V9.

Tableau 41 : Etude de l'évolution des profils d'A.G. de *Pseudomonas stutzeri* V3 et V4 et de *Sphingomonas paucimobilis* V6 en fonction des conditions de culture.

Tableau 42 : Etude de l'évolution des A.G. de *Brevundimonas vesicularis* V1 et V7 en fonction des conditions de culture.

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma de l'embouteillage d'eau de boisson.

Figure 2 : Soutireuse de la ligne 5 de la « Source du Clos de l'Abbaye ».

Figure 3 : Carte de distribution des eaux de boisson embouteillées (Saint Amand 1996).

Figure 4 : Evolution de la microflore viable et cultivable de l'eau minérale embouteillée de la Grande Source, Vittel (Delattre *et al.* 1988).

Figure 5 : Evolution de la microflore totale de l'eau minérale embouteillée de la Grande Source, Vittel (Delattre *et al.* 1988).

Figure 6 : Représentation schématique des enveloppes des bactéries à Gram négatif en coupe transversale.

Figure 7 : Géométrie des doubles liaisons dans les acides gras.

Figure 8 : Evolution des acides gras de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* à 5°C (a) et 30°C (b) d'après Cullen *et al.* (1971).

Figure 9 : Coupe géologiques des forages des eaux minérales de Saint Amand.

Figure 10 : Schéma représentatif du microscope à épifluorescence.

Figure 11 : Extraction, analyse et identification d'une culture pure.

Figure 12 : Schéma du chromatographe gaz / spectromètre de masse (CPG/SM).

Figure 13 : Schéma des principales régions d'une CPG/SM à filtre quadripolaire à simple pompage du vide.

Figure 14 : Evolution de la population cultivable sur R2A rencontrées dans deux eaux minérales françaises à l'émergence (A, Source du Clos de l'Abbaye et B, Source Vauban) au cours d'une année.

Figure 15 : Evolution du nombre de bactéries totales libres et des bactéries viables cultivables dans les deux eaux minérales embouteillées (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Figure 16 : Evolution de la population bactérienne adsorbée sur les bouteilles plastiques de deux marques d'eau minérale (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Figure 17 : Cercle de corrélation établi par Analyse en Composante Principale (ACP), de la variabilité du nombre d'UFC/ml dans des bouteilles prélevées sous 9 becs différents (B25 à B60 à intervalle de 4).

Figure 18 : Cercle de corrélation établi par Analyse en Composante Principale (ACP), de la variabilité du nombre d'UFC/ml dans des bouteilles prélevées sous un même bec pour dix rotations consécutives de la soutireuse (RI à RX).

Figure 19 : Evolution de la flore viable cultivable sur PCA de l'eau embouteillée des sources Vauban et du Clos de l'Abbaye, au cours du premier mois d'entreposage.

Figure 20 : Dénombrement de la flore viable cultivable de l'eau minérale SDCA après 1 semaine (A), 1 mois (B) et 3 mois (C) de stockage des produits finis à 20°C, sur 3 milieux gélosés (R2A, PCA et PCA/10) incubés jusqu'à 21 jours à 20°C.

Figure 21 : Dénombrement de la flore viable cultivable de l'eau minérale Vauban après 1 semaine (A), 1 mois (B) et 3 mois (C) de stockage des produits finis à 20°C, sur 3 milieux gélosés (R2A, PCA et PCA/10) incubés jusqu'à 21 jours à 20°C.

Figure 22 : Dénombrement (apparition et cumul) de la microflore viable et cultivable des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye, stockée 3 mois à 20°C, sur 6 milieux gélosés (R2A, PCA, PCA/10, PCA/10 MM, PCA/10 MO et PCA/10 MOM) incubés jusqu'à 21 jours à 20°C.

Figure 23 : Dénombrement (apparition et cumul) de la microflore viable et cultivable des eaux embouteillées de la Source Vauban, stockée 3 mois à 20°C, sur 6 milieux gélosés (R2A, PCA, PCA/10, PCA/10 MM, PCA/10 MO et PCA/10 MOM) incubés jusqu'à 21 jours à 20°C.

Figure 24 : Evolution du nombre de bactéries totales, viables, cultivables et mortes dans les eaux échantillonnées au niveau du forage, avec déterminations des cellules cultivables sur milieu gélosé R2A et des autres dénombrements après coloration au Live/Dead®.

Figure 25 : Evolution du nombre de bactéries totales, viables, cultivables et mortes dans l'eau minérale embouteillée Vauban. Déterminations des cellules cultivables sur milieu gélosé R2A et des autres dénombrements après coloration au Live/Dead®.

Figure 26 : Evolution de la microflore viable et cultivable des eaux embouteillées âgées de 2 à 3 ans de la Source du Clos de l'Abbaye.

Figure 27 : Evolution des différents types physiologiques (viable cultivable, viable non cultivable...) de la population microbienne d'eaux embouteillées âgées de 2 ans, après ajout de peptone.

Figure 27' : Evolution des différents types physiologiques (viable cultivable, viable non cultivable...) de la population microbienne d'eaux embouteillées âgées de 2 ans, après ajout de peptone.

Figure 28 : Evolution de la flore entéroccoccale viable cultivable dans les eaux de la Source du Clos de l'Abbaye.

Figure 29 : Evolution de la flore entéroccoccale viable cultivable dans les eaux de la Source Vauban (1^{ère} étude).

Figure 30 : Evolution de la flore entéroccoccale viable cultivable dans les eaux de la Source Vauban (2^{ème} étude).

Figure 31 : Evolution de la flore entéroccoccale viable cultivable dans les eaux de la Source Vauban (2^{ème} étude).

Figure 32 : Recherche d'ADN extrachromosomique après lyse directe et électrophorèse verticale en gel d'agarose.

Figure 33 : Stabilité du logarithme du nombre de bactéries totales (AODC) et viables cultivables (sur milieu R2A) dans les eaux minérales embouteillées de la source Vauban.

Figure 34 : Stabilité des profils d'acides gras totaux des microflores embouteillées de la source Vauban.

Liste des photographies

Photo 1 : Saint Amand – Thermal – L’Homme au bain.

Photo 2 : Bar à eau de la Source Chomel – Vichy.

Photo 3 : Une Soutireuse.

Photo 4 : Convoyeurs de packs (ligne 5).

Photo 5 : Convoyeurs de packs (ligne 5).

Photo 6 : Une housseuse.

Photo 7 : Exemple de contamination fongique dans une eau minérale embouteillée d’après Fujikawa *et al.* (1997).

Photo 8 : Microphotographies en microscopie électronique à balayage de *Vibrio parahaemolyticus* 38C1. A, cellules jeunes en phase logarithmique ; B, cellules à jeun depuis une semaine à 3,5°C (Jiang et Chai 1996).

Photo 9 : Microphotographies électroniques de polysaccharides colorés de cellules de *Vibrio vulnificus*. (A) cellules à T0 dans de l’eau de mer artificielle. (B) cellules au point de non cultivabilité ; Linder et Oliver (1989).

Photo 10 : Colonies de *Vibrio cholerae* apparues après un choc thermique de cellules non cultivables sur M9 salé. (1) sans traitement ; (2) culture sur gélose avec traitement thermique (45°C pendant 1 minute) ; d’après Wai *et al.* (1996).

Photo 11 : (A) *Pseudomonas putida* tuée par du glutaraldéhyde, colorée par du CTC à 60°C pendant 1 h et observée à l’objectif 100 au microscope à épifluorescence (barre 10 µm). (B) EX296 tuée par du glutaraldéhyde, colorée par du CTC à 60°C pendant 1 h et observée à l’objectif 100 au microscope à épifluorescence (barre 10 µm) ; d’après Walsh *et al.* (1995).

Photo 12 : (A) cellules végétatives d’EX296 colorées au CTC et observées au microscope à épifluorescence (barre 10 µm). (B) cellules végétatives d’EX296 colorées par l’INT et observées au microscope photonique à l’objectif 100 (barre 10 µm) ; d’après Walsh *et al.* (1995).

Photo 13 : Images de culture d’*Escherichia coli* K12 J62 (A et C) et d’*Enterobacter faecalis* (B et D) respectivement avant et après incubation en présence de ciprofloxacine (barre 5 µm) d’après Barcina *et al.* (1995).

Photo 14 : Le griffon de la Source du Clos de l’Abbaye.

Photo 15 : Etiquette d’une eau embouteillée de la Source du Clos de l’Abbaye.

Photo 16 : Le griffon de la Source Vauban.

Photo 17 : Etiquette d'une eau embouteillée de la Source Vauban.

Photo 18 : Chaîne d'embouteillage de la ligne 5.

Photo 19 : Chaîne d'embouteillage de la ligne 9.

Photo 20 : Système de filtration appelé mouchard.

Photo 21 : Microscope à épifluorescence Optiphot 2, Nikon.

Photo 22 : Chromatographie GC 17-A couplée au spectromètre de masse QP-5000.

Photo 23 : Observation au microscope électronique de la microflore de l'eau du griffon Vauban.

Photo 24 : Planche photographique des bactéries adsorbées sur les parois des bouteilles plastiques observées en microscopie électronique à balayage.

ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AG	Acide Gras
AO	Acridine Orange
ARN	Acide RiboNucléique
ATB	AnTiBiotique
ATCC	American Type Culture Collection
BEA	Bile Esculine Azide
CDCFDA	CarboxyDiChloroFluorescéine DiAcetate
CFDA	6-CarboxyFluorescéine DiAcetate
CFW	Calca Fluor White
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG/SM	Chromatographie Phase-Gaz/ Spectromètre de Masse
CTC	5-Cyano 2,3-ditolyl Tetrazolium Chloride
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhenylIndole
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und zellkulturen gmbh
DVC	Direct Viable Count
FDA	Fluoresceine DiAcetate
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
INT	2-p.Iodophenyl-3-p.Nitrophenyl-5-phenyl-Tetrazolium chloride
L/D	Live/Dead
MH	Mueller Hinton
MTT	Methyl Thiazolyldiphenyl Tetrazolium
NBT	NitroBlue Tetrazolium
NT	Nutrient Test
PCA	Plate Count Agar
Rh 123	Rhodamine 123
SFDA	5,6-SulfoFluoresceine DiAcetate
TSA	Trypticase Soy Agar
TSBA	Trypticase Soy Blood Agar
TTC	Triphenyl Tetrazolium Chloride
UFC	Unité Formant Colonie

VC	Viable Cultivable
VNC	Viable Non Cultivable
XTT	3' {[1-phenylamino-carbonyl]-3,4 tetrazolium}-bis (4methoxy-6nitro) benzen
PLFA	PhosphoLipid Fatty Acid

REMERCIEMENTS

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

RESUME

AVANT PROPOS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

ABREVIATIONS

GENERALITES

Histoire	I
1- L'Antiquité	
2- XIII-XVIII ^{ème} siècle	
3- XVIII-XIX ^{ème} siècle	
4- L'industrialisation du 20 ^{ème} siècle	
L'origine des eaux minérales	IV
1- Les sels dissous	
2- Les gaz	
3- L'eau	
Origine météorique	
Origine juvénile	
Origine fossile	
Hypothèse actuelle sur cette origine	
Conclusion	
4- La circulation des eaux dans les sous-sols	
La composition des eaux minérales	VII
Introduction	
1- Les éléments majeurs	
2- Les gaz	
3- Les éléments mineurs	
La législation	IX
1- Définition	
2- Les contrôles des eaux minérales	
3- Les autorisations d'exploitation	
L'embouteillage	XII
1- L'eau du griffon, matière première	
La déferrisation et démanganisation	
La gazéification des eaux plates	
2- L'emballage	
Les bouteilles en verre	
Les bouteilles plastiques	
3- Le remplissage	

Le rinçage	
Le soutirage	
Le bouchage	
L'étiquetage et le datage	
4- Le sur-conditionnement	
Le fardelage	
La palettisation	
Le drapage	
Le houssage	
Le gerbage	
Le transport et le stockage	

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I/ Les eaux minérales	1
I.1/ Introduction	1
I.2/ La nature de microflore des eaux minérales	3
I.3/ Le métabolisme de ces bactéries	5
I.4/ L'évolution de la microflore des eaux de forages et embouteillées	6
I.5/ L'identité des bactéries des eaux minérales	9
I.5.1/ L'eau du griffon	9
I.5.2/ Les eaux en bouteille	11
I.6/ Les méthodes d'identification de ces bactéries	12
I.7/ L'innocuité de la microflore des eaux minérales	13
1.7.1/ La microflore	
1.7.2/ Les caractéristiques de virulence des bactéries	14
I.7.2/ La multirésistance de cette microflore	15
I.7.3/ L'effet de barrière	16
I.8/ L'origine des bactéries des sous-sols	18
II/ La survie des bactéries des environnements aquatiques	20
II.1/ La morphogénèse durant l'état de survie	21
II.2/ L'adhésion et la colonisation bactérienne lors de l'état de survie	24
II.3/ Le métabolisme des cellules dans les périodes de survie	24
II.4/ La survie-carence de <i>Pseudomonas</i>	27
II.5/ La cultivabilité	28
II.5.1/ La morphogénèse des bactéries viables mais non cultivables (VBNC)	28
II.5.2/ Les caractères affectant cette cultivabilité	30
II.5.3/ Le métabolisme des VBNC	30
II.5.4/ La résurrection des cellules VBNC	31
II.5.5/ L'innocuité de bactéries VBNC	33
II.5.6/ La cultivabilité de <i>Pseudomonas</i>	34
III/ La nature et la mise en évidence d'une microflore environnementale	34
III.1/ Les bactéries viables cultivables	34
III.2/ Les bactéries viables non cultivables	36
III.2.1/ Le contrôle de l'activité respiratoire des bactéries	40
III.2.2/ Le contrôle de l'activité enzymatique	44
III.2.3/ Le contrôle de l'activité métabolique	45
III.2.4/ Le contrôle de l'intégrité membranaire	47
III.3/ Les acides gras des microorganismes	50

III.3.1/ Introduction	50
III.3.2/ Paramètres influant la composition des acides gras bactériens	51
III.3.2.1/ Facteur nutritionnel	54
III.3.2.2/ Paramètres physico-chimiques	55
III.3.2.3/ Phase de croissance	56
III.3.2.4/ Régulation de la fluidité membranaire	57
III.3.3/ Taxonomie des micro-organismes	58
III.3.4/ Caractérisation de communautés microbiennes	60

MATERIELS ET METHODES

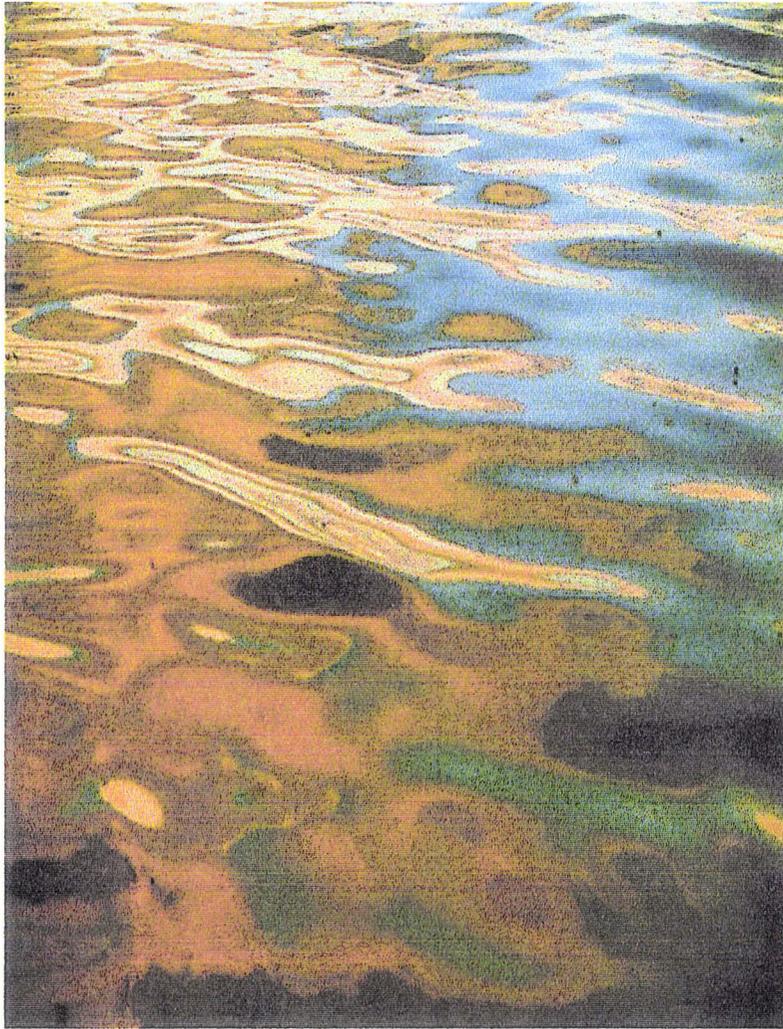
I/ Les forages	62
I.1/ La Source du Clos de l'Abbaye	62
I.1.1/ La géographie	62
I.1.2/ L'hydrogéologie	62
I.1.3/ L'exploitation	63
I.1.4/ La qualité des eaux	63
I.1.5/ La datation de l'eau	64
I.2/ La Source Vauban	64
I.2.1/ La géographie	64
I.2.2/ L'hydrogéologie	64
I.2.3/ L'exploitation	64
I.2.4/ La qualité des eaux	65
II/ Les chaînes d'embouteillage	66
II.1/ La ligne 5	66
II.2/ La ligne 9	66
III/ L'étude de la microflore des eaux minérales	67
III.1/ Les prélèvements	67
III.2/ La filtration	67
III.3/ La mise en évidence des différents types (viables, cultivables...) physiologiques des bactéries	68
III.3.1/ La microscopie à épifluorescence couplée à l'analyse d'image	68
III.3.1.1/ Le principe	68
III.3.1.2/ L'utilisation du microscope à épifluorescence	69
III.3.1.3/ Le dénombrement des cellules sur membrane	70
III.3.2/ Les cellules totales	71
III.3.3/ Les cellules viables cultivables (VC)	72
III.3.3.1/ Le choix des milieux de culture	72
III.3.3.2/ Le dénombrement de cellules viables cultivables (VC)	73
III.3.4/ Les cellules viables non cultivables (VNC)	74
III.3.4.1/ Les cellules viables respirantes	74
III.3.4.2/ Les cellules viables basées sur l'intégrité membranaire	74
III.3.4.3/ Les cellules viables métaboliquement actives	74
III.3.4.3.1/ L'isolement des bactéries d'eaux minérales du griffon	75
III.3.4.3.2/ La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)	75
III.3.4.3.3/ La détermination des caractéristiques géométriques témoins des différentes bactéries	75
III.3.4.3.4/ Les colorations	76
III.3.4.3.5/ Les tests d'élongation des bactéries cultivées en présence de quinolones	76

III.3.4.3.5.1/ L'étude de l'élongation de la souche Ev avec différentes quinolones	76
III.3.4.3.5.2/ La détermination de la morphométrie des bactéries inhibées par un antibiotique	77
III.3.4.3.6/ Le dénombrement et la caractérisation des différentes bactéries constituant une population mixte, par test d'élongation.	77
III.3.4.3.6.1/ L'essai <i>in situ</i> sur l'eau minérale	76
III.3.4.3.6.2/ Le dénombrement et la caractérisation d'une population bactérienne mixte dans un bouillon riche et dans l'eau minérale, avec une méthode « Direct Viable Count » améliorée.	77
III.3.5/ Les cellules mortes	78
III.4/ La recherche de procaryotes et de micro eucaryotes dans les eaux de forage	78
III.4.1/ Les procaryotes	78
III.4.1.1/ Les bactéries aérobies	78
III.4.1.2/ Les bactéries anaérobies	79
III.4.1.3/ La flore planctonique	79
III.4.1.4/ L'investigation de la microflore par la microscopie électronique	79
III.5/ L'évolution de la microflore des eaux de griffon et embouteillées	80
III.5.1/ La variabilité de la population bactérienne des eaux embouteillées	80
III.5.2/ L'évolution des microorganismes viables et cultivables dans les forages	80
III.5.3/ L'évolution des micro-organismes des différentes eaux (forage et chaîne) conditionnées dans les bouteilles	81
III.5.4/ L'étude de facteurs influents sur l'évolution de la microflore des eaux embouteillées Source Du Clos de l'Abbaye (SDCA)	83
III.6/ La caractérisation et l'identification des bactéries aquicoles isolées des eaux du griffon et des bouteilles	84
III.6.1/ Le «Nutrient Tolerance» (NT)	84
III.6.2/ Les profils biochimiques	85
III.6.3/ Les profils d'Acides Gras (AG)	88
IV/ L'innocuité des eaux minérales	88
IV.1/ La multirésistance des bactéries aquicoles	88
IV.1.1/ L'échantillonnage et le dénombrement	88
IV.1.2/ L'isolement	88
IV.1.3/ L'identification	88
IV.1.4/ L'étude de la résistance aux antibiotiques	88
IV.1.5/ La recherche de plasmide	90
IV.2/ La contamination des eaux minérales par <i>Enterococcus faecalis</i>	91
V/ La recherche de bio marqueurs (Acides Gras) dans les eaux minérales	92
V.1/ L'extraction d'acides gras	92
V.2/ La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	93
V.2.1/ La définition	93
V.2.2/ Le principe	94
V.2.3/ L'utilisation de la CPG/SM	96

V.3/ La sensibilité de la technique	98
V.4/ L'étude des profils d'acides gras globaux des eaux minérale (griffon et bouteille)	98
V.4.1/ L'étude de la stabilité du profil d'acides gras d'une communauté bactérienne issue d'eaux minérales naturelles	98
V.4.2/ L'étude du profil d'acides gras des isolats aquicoles	98
 RESULTATS et DISCUSSION	
I/ La microflore des eaux minérales des griffons de la Source Vauban et de la Source du Clos de l'Abbaye	98'
I.1/ Recherche de microorganismes atypiques et d'indicateurs de contaminations fécales dans les échantillons	98'
I.2/ Dénombrement des cellules viables et des cellules cultivables dans l'eau minérale à l'émergence	98'
I.3/ Examen en microscopie électronique de la microflore aquatique du forage Vauban	100
I.4/ Identification des souches isolées des deux eaux minérales au niveau du griffon	100
I.5/ Discussion	100
I.6/ Conclusion	106
II/ La microflore des eaux minérales embouteillées des Sources Vauban et du Clos de l'Abbaye	109
II.1/ Evolution de la population bactérienne libre	109
II.2/ Evolution des bactéries fixées sur les parois des bouteilles	109
II.3/ La microflore bactérienne totale (libre et adsorbée) dans les bouteilles d'eaux minérales	111
II.4/ Etude de l'adsorption des bactéries sur les parois des bouteilles	111
II.5/ Mise en évidence d'ultramicrobactéries et d'ultramicrocolonies sur les parois des bouteilles en PET et PVC par microscopie électronique à balayage	115
II.6/ Identification des souches les plus représentatives isolées des deux eaux minérales naturelles embouteillées	115
II.7/ Discussion	117
II.8/ Conclusion	119
III/ Propriétés de la microflore des eaux minérales	122
III.1/ Variabilité de la population bactérienne des eaux embouteillées	122
III.2/ Comparaison des caractères nutritifs et de l'identification entre les bactéries isolées des eaux minérales des forages et des bouteilles	122
III.3/ « Nutrient Tolerance »	129
III.4/ Discussion	129
III.5/ Conclusion	133
IV/ Considérations taxonomiques et écologiques de la population bactérienne des eaux minérales naturelles	134
IV.1/ Classification	134
IV.1.1/ Considérations taxonomiques	134
IV.1.2/ Considérations écologiques	134
IV.1.2.1/ Comparaison des population de la Source Vauban entre le forage et les bouteilles	139
IV.1.2.2/ Comparaison des populations de la Source du Clos de l'Abbaye	139

IV.1.2.3/ Comparaison des populations entre les deux forages	146
IV.1.2.4/ Comparaison des populations entre les deux eaux embouteillées	146
IV.1.3/ Considérations taxonomiques et écologiques basées sur les profils d'acides gras	146
IV.1.3.1/ Comparaison entre les populations du forage Vauban et ses eaux embouteillées	147
IV.1.3.2/ Comparaison entre les populations du forage du Clos de l'Abbaye et ses eaux embouteillées	147
IV.1.3.3/ Comparaison des populations entre les deux forages	147
IV.1.3.4/ Comparaison des populations entre les eaux embouteillées	153
IV.2/ Discussion	153
IV.3/ Conclusion	155
V/ Etude de la viabilité et cultivabilité des bactéries des eaux minérales	158
V.1/ La cultivabilité sur gélose Plate Count Agar (PCA) de la microflore de nos eaux minérales embouteillées	158
V.2/ Optimisation des dénombrements des bactéries des eaux minérales : choix des milieux de culture	159
V.2.1/ Source du Clos de l'Abbaye	159
V.2.2/ Source Vauban	162
V.3/ Etude de facteurs biochimiques influençant l'évolution des populations bactériennes viables et cultivables des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye : recherche de facteurs limitant	167
V.4/ Etude des états de dormance de la microflore des eaux minérales de Vauban	170
V.5/ Etude des effets d'un stockage prolongé (2 à 3 ans) sur la population bactérienne totale, viable, viable cultivable, viable non cultivable et morte dans des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye	174
V.6/ Effet de l'ajout de peptone sur les différents types physiologiques bactériens de la communauté microbienne des eaux minérales embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye	178
V.7/ Conclusion	181
VI/ Implication sanitaire de la population bactérienne des eaux minérales	184
VI.1/L'effet barrière des eaux minérales à l'égard d'une contamination entérococcale	184
VI.1.1/ Vauban	184
VI.1.2/ Source du Clos de l'Abbaye	184
VI.1.3/ La revivification	188
VI.1.4/ Discussion	188
VI.1.5/ Conclusion	192
VI.2/ La multirésistance des bactéries des eaux minérales	194
VI.2.1/ Echantillonnage et dénombrement	194
VI.2.2/ Identification	194
VI.2.3/ Etude de la résistance	194
VI.2.4/ Recherche de plasmide	196
VI.2.5/ Discussion	196

VI.2.6./ Conclusion	200
VII/ Méthodes nouvelles d'investigation de la microflore des eaux minérales	202
VII.1/ Dénombrement et caractérisation des bactéries de l'eau minérale par une méthode « Direct Viable Count » modifiée	202
VII.1.1/ Identification des isolats de l'eau minérale	202
VII.1.2/ Sensibilité des isolats aux (fluoro)quinolones	204
VII.1.3/ Détermination des caractéristiques géométriques des isolats non inhibées	204
VII.1.4/ Altérations morphométriques des isolats après incubation dans un bouillon Mueller Hinton en présence de différentes (fluoro)quinolones	207
VII.1.4.1/ La morphométrie de la souche Ev après inhibition en présence de différentes (fluoro)quinolones	207
VII.1.4.2/ La morphométrie de différentes souches sous incubation en Mueller Hinton contenant les fluoroquinolones les plus efficaces	207
VII.1.5/ Dénombrement et caractérisation des isolats dans des cultures mixtes expérimentales par la méthode DVC modifiée	209
VII.1.6/ Discussion	209
VII.1.7/ Conclusion	214
VII.2/ Etude de la stabilité de la microflore des eaux minérales par les profils d'acides gras totaux. Evolution des profils d'acides gras des isolats en culture pure sur milieu R2A et en eau minérale.	216
VII.2.1/ Identification des phénotypes isolés de l'eau minérales embouteillée (Source Vauban)	216
VII.2.2/ Stabilité du logarithme du nombre de bactéries totales et viables cultivables	218
VII.2.3/ Stabilité des profils d'acides gras totaux des microflores embouteillées	218
VII.2.4/ Etude de l'évolution des profils d'acides gras des différents phénotypes après culture sur milieu R2A et en eau minérale	220
VII.2.5/ Conclusion	224
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	225
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	227



GENERALITES

« *L'eau* parle sans cesse et jamais ne se répète »

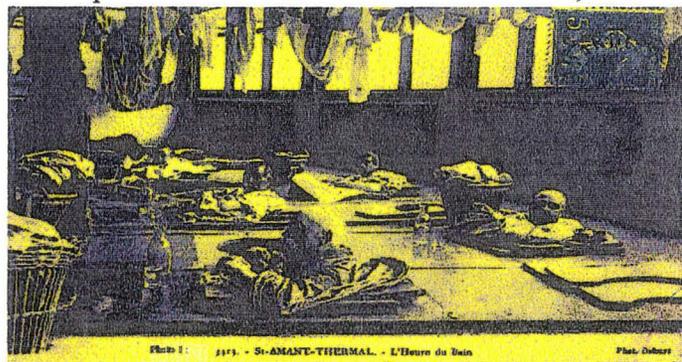
« *El agua* habla sin cesar y nunca se repite »

Octario Paz (1914-) –Libertad bajo palabra, I, Condicion de nube

HISTOIRE

janvier 1999

1- Antiquité. La connaissance des eaux minérales remonte loin dans l'histoire de l'humanité. Ces eaux n'ont pas manqué d'exciter la curiosité par leur thermalité, leur odeur, leur aspect, leur saveur et par le dépôt de couleurs diverses. Dans la Grèce antique, des profanes prenaient des bains dans certaines sources, accompagnés de frictions, d'onctions et de fumigations. Plus de cinq siècles avant Jésus-Christ de nombreux médecins recommandaient déjà les eaux minérales. Malades et élégants effectuent alors des saisons d'eaux à Aedepsos en Eubée ou à Lebedos. Au II^{ème} siècle, un médecin du nom de Galien, nous apprend que les individus sujets à la gravelle (calculs rénaux) consommaient des eaux minérales. C'est à Rome que les thermes et les stations thermales connaissent leurs heures de gloire. La connaissance des vertus thérapeutiques des différentes eaux s'accroît. Les eaux alumineuses sont conseillées aux personnes atteintes de paralysie. Les eaux bitumeuses sont recommandées pour leurs vertus purgatives et les eaux nitrées pour leurs effets bénéfiques sur les écrouelles... Au I^{er} siècle, dans



son *Histoire Naturelle* en 37 tomes, Pline l'Ancien dresse un éloge vibrant des eaux minérales : « Certaines guérissent les plaies ; d'autres sont bonnes pour l'estomac, les nerfs, le corps tout entier. Sous des noms divers, elles augmentent le nombre des divinités et fondent des villes, entre autre Aix, dans la province narbonnaise ». Les thermes prolifèrent dans l'ensemble de l'Empire. La Gaule romaine voit la construction de thermes à Vicus Calidus (Vichy), Auditiacus (Saint Galmier (Badoit)) ou encore Aix-les-Bains. A l'époque romaine, ces stations sont des lieux particulièrement animés ; des gens y viennent pour se soigner, y boire de l'eau, se baigner, prendre des douches et des bains de boues.

2- XIII-XVII^{ème} siècle. Le déclin du thermalisme, consécutif à la chute de l'Empire romain, n'empêcha pas les eaux, consacrées par l'empirisme et la tradition, de conserver une clientèle régionale. La véritable vogue des eaux, en Occident, réapparaît d'abord dans la région de Cadix, en Espagne, grâce à l'influence arabe. Plus tard, les croisés de retour d'Orient contribuent à leur tour à la réhabilitation des eaux. Au XIII^{ème} siècle, un alchimiste et médecin espagnol, Arnaud de Villeneuve publie le *Traité des eaux médicales*. Dans la seconde moitié du XV^{ème} siècle, différentes personnalités italiennes se penchent sur les vertus médicales des eaux minérales. La pratique des bains thermaux se propage à nouveau au XVI^{ème}. Les études à caractère ou prétention scientifique se multiplient, en particulier en Italie et en Allemagne. Il existe une conception épicurienne des bains mais elle n'est pas dominante au XVI^{ème} siècle. Attrait croissant pour les vertus médicinales des eaux minérales et influence catholique se conjuguent au contraire pour faire des bains des lieux de rigueur.

HISTORIQUE

- 1 Antiquité
- 2 XIII-XVII^{ème} siècle
- 3 XVIII-XIX^{ème} siècle
- 4 L'industrialisation du 20^{ème} siècle



Mesures d'ordre, mesures de police, mesures d'hygiène ; après des siècles de déclin, les bains renaissent au XVI^{ème}, mais leur nature a changé. Ce sont désormais des lieux à vocation médicale auxquels la puissance publique va s'intéresser de plus en plus, multipliant les réglementations.

La première réglementation nationale vit le jour au début du XVII^{ème} siècle. L'Etat reconnaît ainsi officiellement les vertus des eaux minérales et crée un début de législation qui, au fil des siècles, va se développer considérablement. C'est également au XVII^{ème} que, la vogue des eaux se généralisant, reprennent à une échelle artisanale, l'embouteillage et le transport des eaux minérales. C'est ainsi que dès 1602, des petites bouteilles («canettes») fabriquées à Vals sont expédiées à la cour de France.

3- XVIII-XIX^{ème} siècle. Au XVIII^{ème}, l'engouement ne se dément pas. A partir de 1735, les «fontainiers», inspecteurs des fontaines publiques, et les ingénieurs des Ponts et Chaussées prennent une part active aux travaux des eaux et des bains. Au début du siècle se développe un commerce, informel mais particulièrement actif, des eaux minérales. Les dérives se multiplient, et pour les contrecarrer, une réglementation nationale est instaurée et perpétuellement remise à jour. Les progrès de la chimie permettent d'avoir une connaissance scientifique des eaux minérales, ce qui donne à l'Etat un argument de poids pour exercer son contrôle au nom de l'intérêt de la santé publique. Le XVIII^{ème} siècle a en effet été marqué par les premières analyses sérieuses sur les eaux minérales, et un nombre considérable d'ouvrages ont été publiés sur le sujet. En retour, les progrès de la recherche sur les eaux minérales contribuent à renforcer considérablement l'engouement en leur faveur.

Décennies de troubles et de guerres, la période révolutionnaire et l'Empire entraînent un déclin du thermalisme. La réglementation bâtie par l'Ancien Régime s'effondre avec lui.

Les régimes qui succèdent à l'Empire consacrent de nombreux débats à la législation des eaux minérales et à la propriété des sources. Le premier texte important est l'ordonnance du 20 décembre 1820. Celle-ci institue l'«Académie de

Médecine» dont la mission est de répondre aux demandes du gouvernement sur tout ce qui intéresse la santé publique et en particulier les eaux minérales. Depuis, aucun texte n'a démenti ce rôle. Sous la Restauration, le pouvoir prend conscience de la nécessité d'une réorganisation générale de la réglementation des eaux minérales. Ainsi, l'ordonnance royale vit le jour le 18 juin 1823, elle n'a jamais été abrogée et les textes législatifs les plus récents en font toujours référence. Cependant le commerce de ces eaux reste soumis à des conditions drastiques. Il faudra attendre les effets de la première révolution industrielle pour que le commerce des eaux soit libéralisé.

C'est au cours du XIX^{ème} siècle que naquit véritablement l'industrie de l'embouteillage de l'eau minérale. Profitant de l'engouement des privilégiés du Second Empire pour les cures thermales –lorsque «prendre les eaux» rimait avec médication et divertissement – certains eurent l'idée de remplir des petits flacons d'eau minérale et d'en faire commerce. Le développement des moyens de transport et notamment le chemin de fer offrit ce qui faisait défaut à ce produit : l'ouverture sur le monde extérieur. Quant à la publicité, ce furent les «Grands» de ce monde qui la véhiculèrent dans les salons. Le respect des propriétés de l'eau minérale et l'originalité du récipient, telles étaient déjà les principales préoccupations des exploitants de l'époque. La terre cuite et le grès (Vichy, Vittel) ou le verre teinté en violet (Uriage) ou brun (Challes) étaient les matériaux les plus fréquemment utilisés, sous forme de bouteilles ou de petits flacons aux capacités les plus diverses. Une fois remplis, bouchés, puis cachetés à la cire, les flacons étaient soigneusement emballés dans des caisses en bois garnies de paille. L'expédition des caisses d'eau minérale se faisait ensuite par chemin de fer ou bateau dans le monde entier. A la fin du siècle dernier, les industries d'embouteillage étaient nombreuses et pour certaines, prospères.

4- L'industrialisation. Le début du XX^{ème} siècle vit cette activité artisanale se transformer progressivement en activité industrielle avec l'introduction de la soutireuse et la généralisation



de l'emballage en verre; c'est également à cette époque que les grandes marques d'eaux minérales s'imposèrent dans le public. La consommation régulière d'eau minérale n'entraîne cependant pas dans nos habitudes. Jusqu'alors vendue en pharmacie ou chez les petits détaillants, l'eau était consommée essentiellement pour ses vertus médicinales. Les demandes de plus en plus pressantes ouvrirent la voie de l'automatisation qui, vers la fin des années soixante, vit son couronnement avec l'essor d'une nouvelle technologie: celle du plastique. La mutation technologique s'accompagna d'une évolution importante dans le comportement des consommateurs. L'image de marque de l'eau minérale dans le public se modifia progressivement grâce à la conjonction de 2 phénomènes: l'irruption du plastique, symbole de l'emballage perdu et la vente en grande surface, symbole cette fois-ci de la société de consommation.

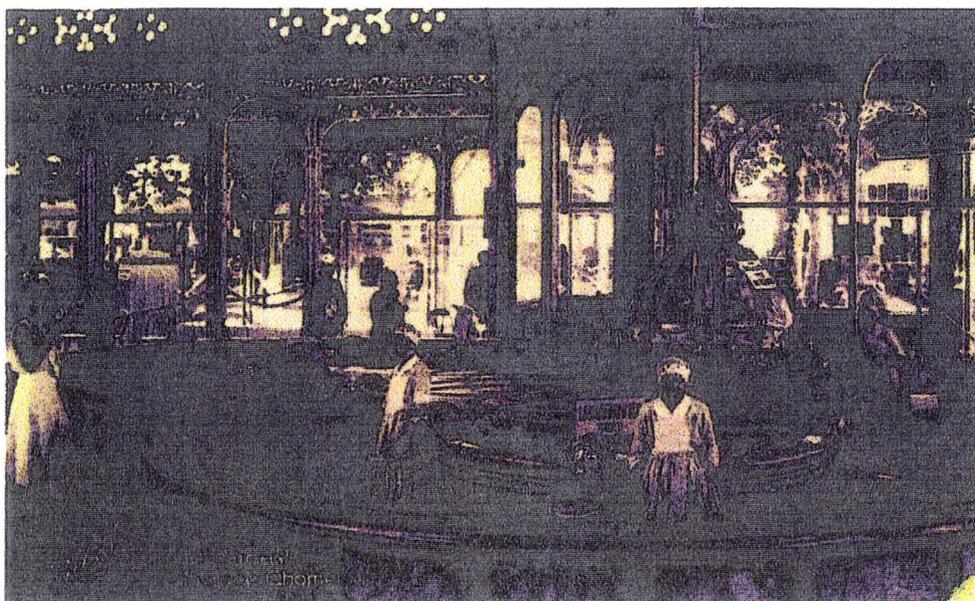


Photo 2 : Bar à eau de la Source Chomel - Vichy

ORIGINE DES EAUX MINÉRALES

janvier 1999

Pour rechercher l'origine des eaux minérales, il faut considérer séparément les trois phases qui les constituent: les sels dissous, les gaz et l'eau.

1/ Les sels dissous

Il est évident que certains sels proviennent du lessivage des terrains traversés. Telle est l'origine des sulfates, des chlorures, des carbonates et du magnésium des eaux qui ont percolé dans le Trias riche en dolomies, en calcaire, en sel gemme et en gypses.

D'autres éléments peuvent provenir des eaux retenues dans les roches depuis leur formation (eaux connées). Tel est le cas du brome et de l'iode abondants dans les eaux liées aux gisements de pétrole. Les eaux de Pêchebronn, en Alsace, voisines d'une ancienne exploitation d'hydrocarbures sont riches en brome.

Mais très souvent, la présence de certains éléments ne peut s'expliquer par une simple dissolution des terrains traversés ou par un mélange avec des eaux connées. C'est pourquoi, nous admettons que certains éléments chimiques proviennent des couches profondes de l'écorce terrestre où ils se sont formés à la suite de phénomènes magmatiques. L'origine profonde de ces éléments peut être confirmée par l'analyse isotopique.

2/ Les gaz

Les principaux gaz associés aux eaux minérales sont le gaz carbonique, l'azote, l'hélium et le radon. Le premier est le plus fréquent et le plus abondant. La plupart des sources riches en gaz carbonique sont situées dans des régions de dislocations récentes, notamment dans le Massif central où elles sont liées à un volcanisme quaternaire. Il serait difficile de nier l'origine profonde de ce gaz et ce d'autant plus que la composition isotopique du carbone qui entre dans sa constitution, est comparable à celle des gaz volcaniques dont l'origine profonde est évidente.

3/ L'eau

De nombreuses controverses ont opposé les hydrogéologues au sujet de l'origine des eaux minérales. Trois origines ont été envisagées:

- volcanique ou "juvénile": origine longtemps admise comme seule possible;
- météorique ou vadose, c'est-à-dire résurgence d'eau issue de précipitations infiltrées dans le sous-sol. Ce système est considéré à l'heure actuelle comme origine essentielle des eaux minérales;
- fossiles, origine possible d'une partie des eaux minérales.

a. Origine météorique

Celle-ci est sans nul doute la principale provenance des eaux minérales.

Les eaux de pluie, lorsqu'elles rencontrent des terrains perméables comme des sables ou des grès, des roches fissurées comme certains massifs cristallins (granite), ou enfin des roches qui comportent des vides importants comme certains massifs calcaires creusés de grottes et avens, s'infiltrent dans le sous-sol. Elles y descendent par gravité jusqu'au moment où leur progression est entravée par la rencontre d'une couche imperméable, d'argile par exemple, ou d'une roche non fissurée. Ces eaux sont appelées vadoses.

En s'infiltrant, les eaux de pluie, acides car chargées en gaz carbonique d'origine

ORIGINES DES EAUX MINÉRALES

1 Sels dissous

2 Gaz

3 Eau

a. Origine météorique

b. Origine juvénile

c. Origine fossile

d. Hypothèse actuelle sur l'origine des eaux minérales

e. Conclusion

4 Circulation des eaux dans les sous-sol



s'enrichissent en sels minéraux. Mais en progressant dans leur descente, les eaux voient leur température du sous-sol augmenter avec la profondeur. Cet accroissement est en moyenne de 1°C par 30m (c'est le gradient géothermique). Toutefois, cette valeur peut être notablement plus forte dans les régions volcaniques par exemple (10 à 15 m) ou plus faible (80 m) dans les granites.

Mais d'autres causes peuvent être à l'origine de la chaleur emmagasinée:

-certaines réactions chimiques comme les oxydations et réductions provoquent un dégagement de chaleur (réactions exothermiques). L'une de ces réactions, très banale dans le sous-sol, est l'oxydation des sulfures de fer (pyrite ou marcasite) qui, avec l'air humide, donne des sulfates ferriques puis des hydroxydes ferreux et ferriques et de l'acide sulfurique avec élévation de la température jusqu'à 300 et 500°C. C'est cette réaction qui déclenche, dans les mines de charbon, l'inflammation spontanée du combustible lorsqu'il est riche en pyrite. De telles réactions peuvent fournir une partie de la chaleur des sources minérales et des gaz thermaux exploités.

-la désintégration des corps radioactifs dégage également de la chaleur: 1g de radium dégage 137 calories par heure. Or, certaines roches sont plus ou moins riches en éléments radioactifs dont la désintégration peut contribuer à l'élévation de la température des eaux souterraines.

b. Origine juvénile

Dans les profondeurs de l'écorce terrestre, sous l'effet de l'augmentation de la pression et de la température, les roches se transforment. Ce phénomène appelé métamorphisme, provoque l'expulsion de l'eau de constitution de certains minéraux. Cette eau est dite "juvénile" car, contrairement aux eaux météoriques constamment brassées dans le cycle de l'eau: évaporation, précipitation, ruissellement ou infiltration, elle apparaît pour la première fois à la surface de la Terre.

Certains ont cru longtemps que, de même que les sels dissous, et les gaz, l'eau des eaux minérales était juvénile.

c. Origine fossile

Les sédiments grossiers et vaseux qui se déposent dans le fond de la mer, des lacs, des lagunes sont imbibés d'eau. Ils vont, au cours de

millénaires, après émergence ou enfouissement dans des couches plus profondes, se transformer en roches dures par expulsion d'une partie de l'eau contenue dans les sédiments d'origine. Mais, une autre partie de l'eau et des sels, notamment dans le cas de sédiments marins, reste piégée dans la roche au même titre que les débris animaux et végétaux qui constituent les fossiles. Cette eau est dite fossile (ou connée) et elle est souvent très riche en éléments dissous car les sels diffusent plus difficilement que l'eau au travers de roches peu perméables comme les argiles. Les eaux fossiles sont particulièrement riches en sodium, iode et brome, éléments que l'on trouve dans certaines eaux minérales.

d. Hypothèse actuelle sur l'origine des eaux minérales

Depuis une trentaine d'années, nous disposons de méthodes d'analyse qui ont permis de classer l'hypothèse de l'origine uniquement juvénile des eaux minérales parmi les vestiges du passé. Ces méthodes consistent à doser dans les eaux thermales, les isotopes de plusieurs éléments dont l'oxygène ^{18}O , le deutérium ^2H , le carbone ^{14}C et le tritium ^3H .

- Oxygène 18 et deutérium

La teneur en oxygène 18 des eaux minérales est en tout point comparable à celle des eaux de pluie.

Nous en déduisons que les eaux minérales ne sont que des eaux météoriques, infiltrées dans les parties superficielles de l'écorce terrestre et revenues en surface à la faveur de thermosiphons, systèmes que nous décrivons plus loin.

D'autre part, il s'est avéré que les teneurs en oxygène 18 et en deutérium de l'eau de pluie aux différentes altitudes étaient liées par une relation linéaire. Nous disposons donc, avec ces éléments, d'un moyen d'évaluer l'altitude à laquelle les eaux se sont infiltrées.

- Tritium

Il est le plus lourd des isotopes de l'hydrogène. Nous avons eu pendant quelques années une indication précieuse fournie par cet élément. En effet, avant les explosions nucléaires dans l'atmosphère qui eurent lieu à partir de 1952, la teneur moyenne en tritium de toutes les eaux, quel que soit leur lieu de prélèvement, était de l'ordre d'un atome de tritium pour 10^8 atomes d'hydrogène. Après les expériences nucléaires cette teneur a atteint jusqu'à 2500 unités en 1964.



Or beaucoup d'eaux minérales ont été marquées par le tritium. C'était la preuve que ces sources contenaient des eaux de pluie infiltrées depuis 1952 dans les couches de l'écorce terrestre. Mais le tritium disparaît rapidement. A l'heure actuelle les teneurs des eaux de surface en tritium, suite à l'arrêt des explosions thermonucléaires, se rapprochent de celles que l'on connaissait avant 1952.

Il faut remarquer que même dans les années 70 par exemple, lorsque le tritium était abondant dans les eaux de surface, celles de terrains profonds comme l'eau des «Sables Verts» albiens du Bassin de Paris ne contenaient que peu de tritium. C'est que la date à laquelle ces eaux se sont infiltrées est antérieure à 1952. En effet, dans le présent et grâce aux analyses du C^{14} qui permet une datation de l'eau, nous considérons qu'elles ont mis 2000 ans pour parvenir au centre du Bassin de Paris. Si l'eau circule relativement rapidement dans les terrains fissurés, elle chemine par contre très lentement dans les terrains poreux (sables et graviers). A Evian, l'eau met 14 ans pour parcourir la distance qui sépare son point d'infiltration de la résurgence. A Vittel, c'est quelques centaines d'années pour quelques kilomètres.

e. Conclusion

L'ensemble des spécialistes admet que la quasi totalité des eaux minérales provient d'eau d'infiltration qui revient en surface grâce à des phénomènes divers. Il est certain que l'eau de nombreux gisements, notamment ceux situés en terrains sédimentaires comme Vittel, Contrexéville, Evian et Thonon, a uniquement pour origine des eaux d'infiltration, mais que cette eau ne parvient aux sources qu'après un long et lent cheminement souterrain au cours duquel elle acquiert des propriétés physiques, chimiques et thérapeutiques. Mais pour des gisements situés en pays cristallins comme ceux du Massif Central ou des Pyrénées, il n'est pas exclu que, pour une part certes faible, l'eau provienne de la profondeur de l'écorce terrestre. Enfin, une partie des eaux, liées à des gisements de sel gemme ou de pétrole, peut être considérée comme fossile.

4/ Circulation des eaux dans le sous-sol

La circulation des eaux dans le sol est essentiellement soumise aux lois de la gravité.

Les phénomènes de capillarité jouent également un rôle dans l'écoulement des eaux souterraines, dans la craie par exemple, mais ce rôle est secondaire et peut être négligé en ce qui concerne les eaux minérales.

Les eaux de pluie qui se sont infiltrées poursuivent leur progression vers le bas tant qu'elles ne rencontrent que des couches perméables. La couche imperméable atteinte, elles s'écoulent comme elles le feraient en surface, selon la plus grande pente. Leur cheminement se poursuit jusqu'au moment où elles trouvent un exutoire: soit une vallée dont les flancs recoupent la couche aquifère, soit une fissure ou un ouvrage de captage qui leur permet de revenir vers la surface grâce à des phénomènes divers.

Il est possible de faire une comparaison avec les gisements d'hydrocarbures qui obéissent aux mêmes lois, à cette différence que les hydrocarbures, étant plus légers que l'eau qui les accompagne, s'accumulent dans les parties hautes des réservoirs alors que l'eau s'accumule dans les parties basses.

Mais au cours de leur progression au sein d'un niveau perméable, les eaux peuvent s'engager sous une couche imperméable et combler l'ensemble des vides de la couche perméable. La nappe se trouve donc "en charge" entre deux niveaux imperméables. Elle est dite captive par rapport aux autres nappes dites libres. Mais, en vertu du principe des vases communicants si, pour une raison ou une autre: faille ou sondage, la couche imperméable supérieure vient à être percée, l'eau peut s'élever au-dessus du niveau où elle se trouve captive et atteindre, aux pertes de charge près, un niveau égal à celui de l'endroit où elle s'est mise en charge, c'est-à-dire où elle a commencé à être captive. Elle peut même, si la topographie s'y prête, jaillir en surface. C'est le phénomène de l'artésianisme appelé ainsi car il a été mis clairement en évidence pour la première fois en Artois. Les eaux minérales captées par sondages sont très souvent artésiennes. Mais parfois le jaillissement en surface n'est pas dû au phénomène des vases communicants mais au dégazage. Il s'agit dans ce cas d'un faux artésianisme.



COMPOSITION DES EAUX MINÉRALES

janvier 1999

La composition chimique est l'un des critères sur lesquels repose la notion d'eau minérale. La concentration des eaux minérales en sels minéraux est parfois supérieure à la limite de 1500 mg/l admise pour les eaux de distribution publique.

Les eaux minérales véhiculent aussi des gaz et peuvent abriter des microorganismes.

Très souvent elles se distinguent des eaux de distribution publique par la quantité et la qualité de leurs composants.

Les différents éléments de cette minéralisation appartiennent à deux grandes catégories:

- les composés présents en quantité notable dans toutes les eaux mais dont la concentration est souvent relativement plus élevée dans les eaux minérales. Ce sont des éléments majeurs.
- les composés généralement méconnus dans les eaux banales, et dont la présence dans les eaux minérales, en quantités souvent infinitésimales, peuvent être responsables de leur classement en tant que telles; selon leur concentration, on les désigne sous le nom d'éléments mineurs et d'éléments traces.

Si les eaux minérales se caractérisent par la présence de certains composés, elles peuvent également se distinguer par l'absence de substances caractéristiques d'apports superficiels telles que l'oxygène.

Moins exposées aux pollutions, de par leur origine profonde, que les eaux superficielles, elles ne contiennent pas ou peu de nitrates, pesticides...

1/ Eléments majeurs

Les substances minérales qui constituent le résidu sec, sont principalement des sels qui appartiennent pour leur partie anionique aux acides dérivés des éléments carbone, soufre et chlore.

Les bicarbonates, anions dérivés du carbone sont présents dans toutes les eaux. Ils sont issus, soit de la décomposition des roches calcaires, soit du dégazage du magma profond, comme c'est le cas dans les eaux thermales du Massif Central qui émergent de région à volcanisme récent et dont ils constituent le principal élément minéralisateur.

Les sulfates, principaux représentants des dérivés oxygénés du soufre peuvent se trouver à des concentrations élevées, acquises, par exemple, au cours du lessivage de gîtes salifères sulfatés inclus dans les terrains, le plus souvent d'âge secondaire, mais parfois également d'âge tertiaire. L'oxydation des minéraux sulfurés peut être aussi l'origine des sulfates.

L'ion chlorure, très répandu dans les eaux minérales peut avoir deux origines différentes, l'une sédimentaire, l'autre magmatique. Les chlorures d'origine sédimentaire proviennent du lessivage d'anciens dépôts évaporatiques; c'est pourquoi, on les trouve associés au sodium avec lequel ils donnent un sel dont l'importante solubilité explique la très forte minéralisation des eaux qui les renferment majoritairement. Dans les régions caractérisées par des manifestations volcaniques récentes, les chlorures en concentrations plus modestes sont comme les bicarbonates, d'origine profonde. Le silicium, élément qui représente en masse les trois quarts de l'écorce terrestre, se trouve dans les eaux minérales sous forme de dérivés oxygénés. Les silicates ou la silice hydratée ont une solubilité qui est très améliorée par la température, c'est ce qui

COMPOSITION DES EAUX

Introduction

1 Eléments majeurs

2 Gaz

3 Eléments mineurs



explique leur plus forte concentration dans les eaux minérales chaudes. Ce sont les eaux sulfurées et les eaux carbogazeuses qui en sont les plus riches.

Aux anions chlorures, sulfates, bicarbonates, sont associés des cations que nous avons coutume de répartir en deux grands groupes: les alcalins et les alcalino-terreux.

Le sodium et le potassium constituent le groupes des cations alcalins. Le sodium prédomine toujours sur le potassium; dans les eaux chlorurées, sa concentration peut dépasser 100 g/l.

Les alcalino-terreux sont toujours associés entre eux, mais de la même façon que le sodium prédomine sur le potassium, le calcium prédomine généralement sur le magnésium.

2/ Gaz

Le gaz carbonique est le plus fréquent; il peut atteindre, dans les eaux minérales, des concentrations incomparablement plus élevées que dans les eaux banales. Ce gaz qui peut avoir une origine biologique dans les eaux de surface est, dans les eaux carbogazeuses d'origine magmatique pour l'essentiel.

C'est à la faveur d'une minéralisation importante en bicarbonates qu'il se trouve en dissolution, et c'est grâce aux fortes pressions qui règnent en profondeur qu'il est maintenu en sursaturation. Au cours de la remontée de l'eau, la diminution de la pression provoque l'échappement du gaz carbonique; il se produit alors une émission gazeuse à l'émergence, ce sont les "gaz spontanés".

Comme le gaz carbonique, l'azote peut constituer une fraction importante des gaz entraînés par les eaux minérales, c'est ainsi qu'il existe des sources dont les "gaz spontanés" renferment plus de 90% d'azote. L'azote est alors, accompagné des gaz rares en proportion élevée (hélium, radon).

3/ Eléments mineurs et éléments traces

La concentration en éléments mineurs est de l'ordre du mg/l, celle des éléments traces est de cent à mille fois moins importante.

Dans le groupe des sels qui présentent des similitudes de propriétés avec les chlorures, on trouve les anions, bromures, iodures, fluorures. Ce sont les eaux riches en sodium qui renferment les

plus fortes concentrations de fluorures.

Parmi les cations alcalins, le lithium mérite une mention particulière, car il est spécifique des eaux minérales, nous ne le rencontrons jamais dans les eaux banales.

La gamme des représentants des cations alcalino-terreux dans les eaux minérales est plus complète que celle des eaux banales; le strontium, le baryum et le béryllium y voisinent avec le calcium et le magnésium.

Les dérivés du soufre, tels que les sulfhydrates et l'hydrogène sulfuré, indésirables notoires des eaux de distribution publique, constituent, à l'inverse, les éléments nobles des eaux sulfurées auxquelles ils confèrent l'odeur caractéristique de "l'œuf pourri".

Les oligo-éléments sont des éléments traces qui jouent un rôle dans les mécanismes biologiques; malgré leur concentration infinitésimale, ils revêtent une importance toute particulière dans les effets thérapeutiques recherchés dans l'utilisation de certaines eaux; ils constituent les éléments rares des eaux oligo-minérales.

Le fer et le manganèse qui sont considérés également comme des éléments indésirables des eaux de distribution publique sont, avec le cuivre, des oligo-éléments très répandus dans les eaux minérales. A côté de ces oligo-éléments courants, nous trouvons aussi, dans certaines eaux minérales des éléments plus rares, tels que le vanadium, l'arsenic, le molybdène et le sélénium.

Enfin, parmi les éléments traces des eaux minérales, nous réservons une place plus spéciale aux éléments radioactifs. En matière de radioactivité, les eaux minérales présentent la particularité de renfermer presque exclusivement, des radio-isotopes naturels car, en raison de la lenteur de leur cheminement, les radioéléments artificiels d'apparition récente, n'ont encore pu accomplir l'intégralité du circuit qui va de l'infiltration à l'émergence. Néanmoins, la présence d'atomes de tritium, hydrogène lourd radioactif qui fait partie intégrante de la molécule d'eau, produit massivement, à partir des premières explosions thermonucléaires atmosphériques de 1952, peut être un indicateur de l'âge des eaux minérales.



LEGISLATION

janvier 1999

Au cours de ces dernières années et devant la demande de plus en plus importante des consommateurs, la production industrielle des eaux minérales a enregistré une croissance annuelle significative et importante. Devant cette situation, le souci majeur des autorités compétentes était la protection des consommateurs, leur assurant ainsi une qualité sanitaire irréprochable des eaux minérales. Pour cela, il était nécessaire de se doter d'une législation définissant les normes de bonne fabrication, les critères de qualité de ces eaux et le contrôle par les services et les laboratoires compétents de la qualité sanitaire des eaux minérales aux stades de l'exploitation des sources naturelles, de la production et de la distribution.

Selon la législation française, une eau minérale naturelle se différencie des autres eaux par des propriétés favorables à la santé dûment constatées par l'Académie Nationale de Médecine et dont la thérapeutique thermale peut tirer parti. L'eau d'une source ne pourra donc prendre l'appellation d'"eau minérale" qu'après avoir été agréée par le Ministère de la Santé qui donne l'autorisation de l'exploiter comme telle, sur avis également du Laboratoire dépendant du Ministère de la Santé.

1/ Définition

Les eaux minérales naturelles conditionnées étant devenues un produit de grande consommation bénéficient d'un statut européen particulier qui a été pris en compte dans la législation française par le décret du 6 juin 1989.

La directive européenne 80/777/C.E.E. donne la définition suivante de l'eau minérale naturelle:

- pureté originelle (origine souterraine à l'abri de tout risque de pollution)
- composition caractéristique constante
- température constante à l'émergence
- bactériologiquement saine (non contaminée)
- non traitée, naturelle (interdiction de stériliser) (autorisation de séparer des éléments instables: fer, soufre, etc.)
- reconnue minérale dans son pays d'origine.

Le décret français du 6 juin 1989 transcrit la Directive Européenne en ces termes: "une eau minérale naturelle est une eau possédant un ensemble de caractéristiques qui sont de nature à lui apporter des propriétés favorables à la santé".

Elle se distingue nettement des eaux destinées à la consommation humaine:

- par sa nature, caractérisée par sa teneur en minéraux, oligo-éléments ou autres constituants, et par certains effets
- par sa pureté originelle, l'une et l'autre caractéristiques ayant été conservées intactes en raison de l'origine souterraine de cette eau qui a été tenue à l'abri de tout risque de pollution.

La réglementation stipule en effet que:

- une eau minérale naturelle, telle qu'elle se présente à l'émergence, ne peut faire l'objet d'aucun traitement ou adjonction autres que ceux autorisés par arrêté ministériel et relatifs à:
 - la séparation des éléments instables, par décantation ou filtration, éventuellement précédée d'une oxygénation, ce traitement ne devant pas avoir pour effet de modifier la composition de l'eau dans ses constituants essentiels;
 - l'élimination de gaz carbonique par des procédés exclusivement physiques;
 - l'incorporation ou la réincorporation de gaz carbonique.

Edictés essentiellement pour faciliter la circulation des eaux minérales conditionnées au sein des Etats de la CEE en supprimant des conditions de concurrence inégales, les textes nouveaux sont très stricts sur la présentation des produits c'est-à-dire, essentiellement, sur celle des étiquettes. Ils interdisent, entre autres, "toute indication attribuant à une eau minérale des

LEGISLATION

- 1 Définition
- 2 Contrôles des eaux minérales
- 3 Autorisation d'exploitation



propriétés de prévention, de traitement ou de guérison d'une maladie humaine". Seules sont tolérées des indications telles que "convient à la préparation des aliments de nourrissons", "convient pour un régime pauvre en sodium" ou "peut être diététique"...

Elle provient d'une nappe ou d'un gisement souterrain exploité à partir d'une ou plusieurs émergences naturelles ou forées, connues pour une stabilité de ses caractéristiques essentielles, notamment de composition et de température à l'émergence, qui n'est pas affectée par le débit de l'eau prélevée. Les textes législatifs soulignent la nécessité de bien connaître le site hydrogéologique de l'eau minérale et précisent la façon dont le contrôle des qualités physico-chimiques et bactériologiques des eaux doit être effectué, tout ceci constitue donc une véritable garantie de qualité.

Une eau minérale naturelle peut bénéficier d'une protection spéciale grâce à l'attribution d'un "périmètre de protection", mais ce dernier ne peut être octroyé que si l'eau a préalablement été reconnue d'"intérêt public". La déclaration d'intérêt public et le périmètre de protection, dont les limites sont proposées par la direction Départementale de l'Industrie et de la Recherche, sont attribués par Décrets Ministériels. Par exemple, tout travail souterrain à l'intérieur de ce périmètre est soumis à autorisation préalable.

Les eaux minérales naturelles ne sont pas stériles. L'article 5 de la Directive C.E.E./777 du 15 juillet 1980 précise que "à l'émergence, la teneur totale en microorganismes revivifiables d'une eau minérale naturelle doit être conforme à son microbisme normal et témoigner d'une protection efficace de la source contre toute contamination... Au stade de la commercialisation, la teneur en microorganismes revivifiables ne peut résulter que de l'évolution normale de la teneur en germes à l'émergence.

L'eau minérale naturelle fournie au consommateur est bactériologiquement saine (indemne de tout germe pathogène, virus, parasites...) et subit des contrôles réguliers de l'émergence au produit fini (bouteille) par les Autorités Officielles et par l'embouteilleur.

2/ Contrôle des eaux minérales

Il est pratiquement impossible de surveiller les eaux de boisson pour y rechercher toutes les bactéries pathogènes susceptibles de les contaminer.

Les spécialistes ont été amenés à mettre au point des méthodes (examens de contrôle) permettant la recherche d'indicateurs de pollution fécale dont la présence témoigne de celle éventuellement de micro-organismes pathogènes. Il est indispensable de procéder à des examens réguliers et fréquents, car la contamination peut être intermittente et de ce fait, non décelée par l'examen d'un seul échantillon.

L'emploi d'organismes intestinaux normaux comme indicateurs de pollution fécale, plutôt que la recherche des organismes pathogènes, est un principe universellement admis pour la surveillance et l'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau distribuée. Un bon indicateur de pollution fécale doit être abondant dans les excréments et très peu fréquent dans les autres milieux, il doit être facile à isoler, identifier, dénombrer, et incapable de se développer dans l'eau. Il doit survivre plus longtemps dans l'eau que les organismes pathogènes et mieux résister qu'eux aux désinfectants.

Nous utilisons pour le contrôle bactériologique de l'eau le groupe des coliformes fécaux qui constitue l'indicateur fondamental. Les streptocoques fécaux et les spores d'anaérobies sulfitoréducteurs sont utilisés comme indicateurs supplémentaires de la pollution.

Critères applicables aux examens microbiologiques à l'émergence

Ces examens doivent comporter notamment :

La démonstration de l'absence de parasites et de micro-organismes pathogènes ;

La détermination quantitative des micro-organismes revivifiables témoins de contamination fécale :

- absence d'*Escherichia coli* et d'autres coliformes dans 250 ml à 37°C et 44,5°C ;
- absence de streptocoques fécaux dans 250 ml ;
- absence d'anaérobies sporulés sulfite-réducteurs dans 50 ml ;
- absence de *Pseudomonas aeruginosa* dans 250 ml ;

la détermination de la teneur totale en micro-organismes revivifiables par millilitre d'eau :

- à 20°C à 22°C en 72 h sur agar-agar ou mélange agar gélatine ;
- à 37°C en 24h sur agar-agar.



3/ Autorisation d'exploitation

Toutes exploitations d'eau minérale doit faire l'objet d'une autorisation délivrée par le Ministre chargé de la santé, après avis de l'Académie Nationale de Médecine. Cette autorisation concerne l'exploitation de l'eau minérale à l'émergence, après transport à distance par canalisation et le cas échéant, après certains traitements ou mélanges.

Les autorisations d'exploitation étaient données sans limitation de durée jusqu'aux environs de 1900, puis sont devenues trentenaires. Des sources prestigieuses comme Célestins, Grande Grille, Hôpital et Chomel à Vichy, Grande Source et Hépar à Vittel, Pavillon à Contrexéville etc., toutes découvertes et mises en valeur au cours des siècles précédents, possèdent ainsi des autorisations et des déclarations d'Intérêt public sans limitation de durée.

Chaque captage d'eau minérale fait l'objet d'une surveillance étroite, menée conjointement par les services de la Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement et la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales. La surveillance réglementaire est effectuée par des laboratoires agréés pour le contrôle des eaux minérales par le Ministère de la santé. Les analyses sont effectuées selon des modalités spécifiques à chaque utilisation.



EMBOUTEILLAGE

janvier 1999

1. L'eau du griffon; matière première. L'eau émergeant au griffon de la source ou à la tête du forage peut subir certains traitements liés à sa composition physico-chimique. Ces traitements physiques peuvent aller d'une filtration grossière, jusqu'à la séparation de composés chimiques instables.

C'est ainsi que certaines eaux de source et la plupart des eaux minérales naturelles gazeuses contiennent du fer et du manganèse dissous. Pour éviter la précipitation de ces éléments et l'apparition de particules insolubles dans les canalisations ou la bouteille, une séparation du fer et du manganèse est donc indispensable avant l'embouteillage. L'élimination de ces deux éléments est obtenue par oxydation et précipitation-coprecipitation suivie d'une filtration.

Les eaux plates peuvent faire l'objet d'un traitement de gazéification au dioxyde de carbone naturel ou de synthèse, qui consiste à l'aide d'un carbonateur à dissoudre des quantités plus ou moins importantes de ce gaz dans l'eau.

2. L'emballage. Il s'effectue avec deux matières, le verre et le plastique.

Le conditionnement en verre ne concerne que les eaux gazeuses et celles destinées à la restauration et au milieu hospitalier. Ces bouteilles sont à leur arrivée dans l'entreprise triées manuellement pour séparer celles qui sont ébréchées ou qui présentent de graves défauts d'aspect. Elles passent ensuite dans la laveuse pour y subir une série de traitements destinés à éliminer les étiquettes ainsi que les traces et dépôts chimiques de toutes natures. Les bouteilles sont dans un premier temps immergées dans une solution de soude, puis la température est portée à 85°C par paliers successifs. Le cas échéant, ces opérations sont complétées par un bain acide qui neutralise les dépôts de calcaire laissés par l'emploi d'eau de lavage très minéralisée. Des bains d'émulsionnant et de stabilisant sont ensuite nécessaires pour éviter l'entartrage sur la paroi des bouteilles. Un lavage avec une solution désinfectante suivi d'un rinçage abondant à l'eau claire rend la bouteille définitivement propre. Les matières plastiques ont envahi le marché des eaux avec deux principaux polymères : le polychlorure de vinyle (PVC) et le polyéthylène téréphtalate (PET). Le PVC résulte de la polymérisation du chlorure de vinyle. Il se présente sous forme de poudre blanche et poreuse. Le PET est, lui, un polyester qui résulte de la polycondensation du bis-bêta-hydroxyéthyltéréphtalate, lui-même obtenu par estérification de l'éthylène glycol et de l'acide téréphtalique. Il se présente sous forme de petits granulés blancs et légèrement hydrophyles.

La fabrication des bouteilles est basée sur deux techniques: extrusion-soufflage et bi-orientation. La première technique se déroule en 3 étapes successives, après gélification du compound et extrusion de la paraison: ouverture de moule, emprisonnement de la paraison entre les mâchoires du moule, fermeture du moule; insufflation d'air comprimé provoquant le gonflement de la paraison jusqu'au placage du PVC contre la paroi du moule refroidi par une

L'EMBOUTEILLAGE

1 L'eau du griffon, matière première

Déferrisation et Démanganisation

Gazéification des eaux plates

2 L'emballage

Les bouteilles en verre

Les bouteilles plastiques



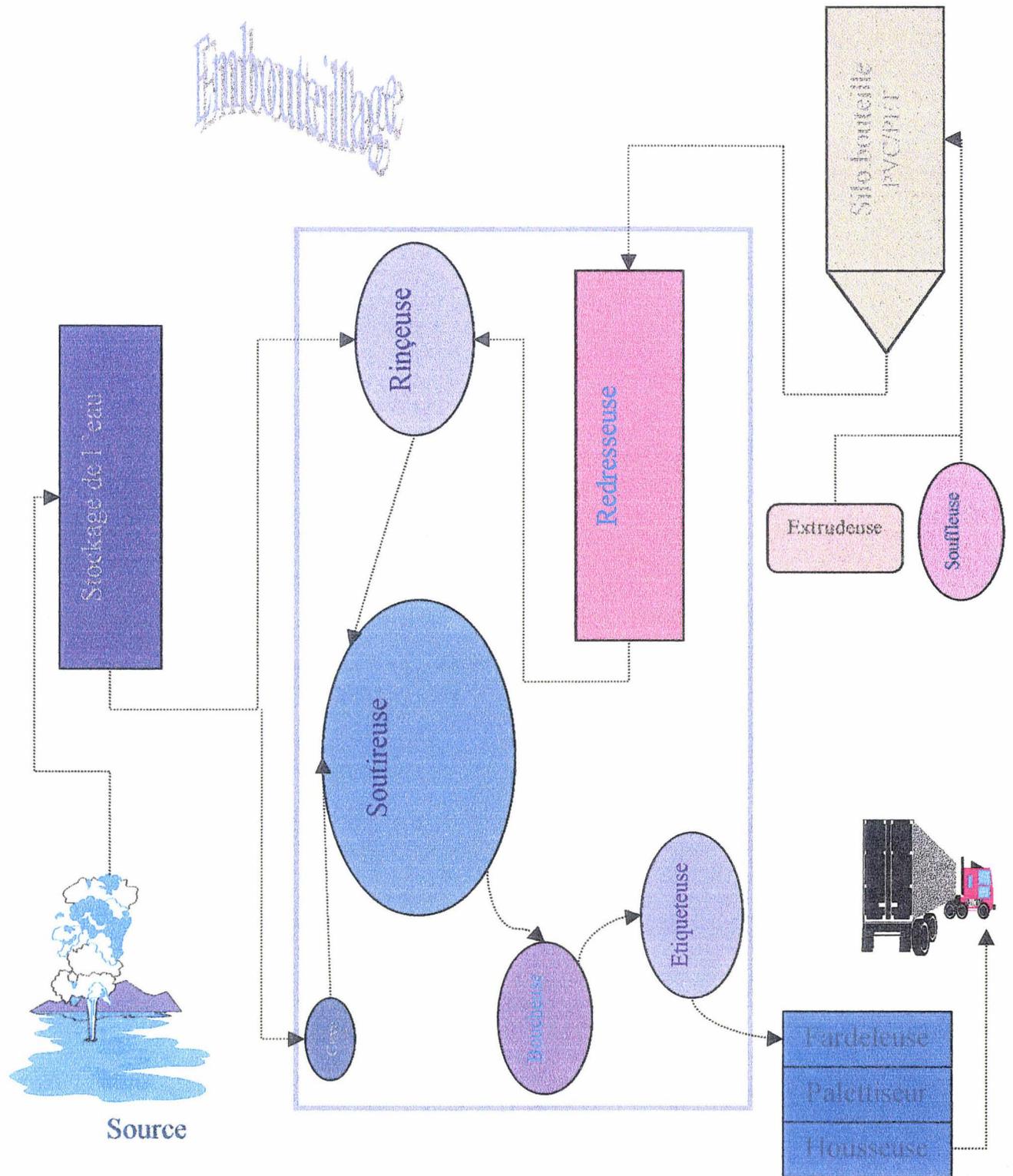


Figure 1 : Schéma de l'embouteillage d'eau de boisson



circulation d'eau; ouverture du moule suivie de l'éjection de la bouteille, puis positionnement du moule devant la raison suivante. La seconde, plus récente, permet d'orienter les macromolécules suivant deux directions privilégiées: l'axe vertical et le diamètre de la bouteille. Elle se déroule en 4 phases successives: extrusion d'une préforme de dimensions réduites (tube muni d'un pas de vis); refroidissement vers 100°C, puis application d'un traitement thermique adéquat; introduction d'un piston qui étire la préforme dans le moule jusqu'à l'obtention de sa taille définitive; l'insufflation d'air comprimé qui plaque la matrice dans la paroi du moule donnant ainsi à la bouteille sa forme définitive.

La capacité des récipients répond à des normes très précises établies au niveau européen. Sont ainsi admis à titre définitif les volumes suivants : 12,5, 20, 25, 33, 50, 75, 100, 125, 150 et 200cl. A noter que si la plupart des eaux conditionnées en France sont commercialisées dans des volumes de 50, 100, 150 et 200 cl, d'autres pays, bien qu'appartenant à la CEE comme le Portugal et l'Espagne, commercialisent des bidons de 5 l et même de 10 litres.

D'autres emballages existent tels que les boîtes métalliques, les gobelets, les briques en carton...

3. Le remplissage.

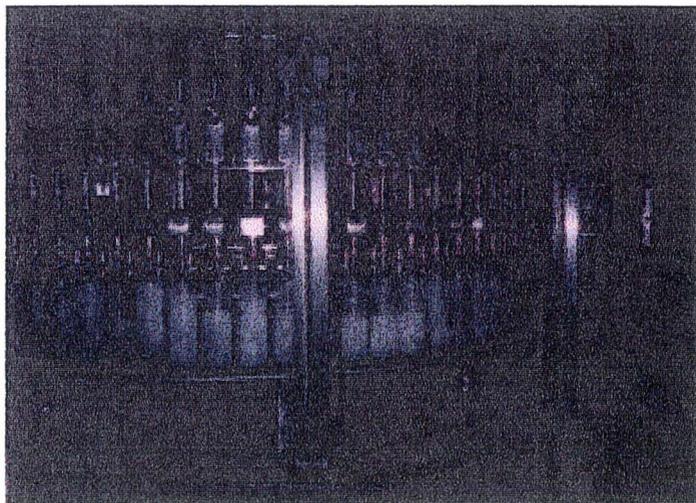
Dès la sortie du silo, les bouteilles pénètrent dans la salle d'embouteillage isolée du reste de l'usine par des cloisons vitrées et parfois sous atmosphère contrôlée (Figure 1).

Elles sont redressées et disposées en file indienne sur un convoyeur qui les acheminera vers le groupe d'embouteillage. Les bouteilles sont rincées afin d'éliminer les particules ou poussières éventuelles. Cette opération ne se retrouve pas sur toutes les chaînes d'embouteillage. Elle s'effectue soit avec de l'air comprimé, soit avec de l'eau de source.

La soutireuse demeure la pièce principale du groupe d'embouteillage. Elle est conçue pour remplir rapidement et précisément les bouteilles. La bouteille vient se plaquer contre un barillet horizontal comportant de nombreux becs. Le bec descend jusqu'au col de la bouteille, une vanne pneumatique s'ouvre alors pour laisser s'écouler l'eau par l'intermédiaire d'une canule, tandis que le barillet poursuit son mouvement rotatif. Lorsque le niveau de l'eau atteint le bec, celui-ci se relève pour libérer la bouteille du barillet et la réinsérer dans la chaîne de distribution.

Ces bouteilles se présentent aussitôt devant la boucheuse. Le bouchage à vis suit le schéma suivant: les bouchons sont redressés puis positionnés sur le col de la bouteille; ils sont alors vissés en force par l'intermédiaire de une ou plusieurs tête. Ce mode de bouchage présente une facilité d'ouverture et de fermeture, une garantie d'inviolabilité, une amélioration de l'efficacité mécanique du bouchage.

Photo 3 : Soutireuse



Les étapes ultérieures sont l'étiquetage ainsi que le datage. Une colle compatible avec le plastique est appliquée soit sur les parois de la bouteille, soit aux extrémités de l'étiquette; ensuite celle-ci est ajustée sur le récipient. La mention d'une date limite de consommation étant obligatoire, elle figure sur la bouteille de plusieurs façons: imprimée en clair, sur-imprimée sur l'étiquette ou le bouchon ou encochée sur une grille datée. Le sur-conditionnement est le prolongement direct de la ligne d'embouteillage. Il sert à emballer les bouteilles pour éviter leur détérioration au cours du transport et du stockage et pour faciliter la manutention.

4. Le surconditionnement.

Le fardelage consiste à recouvrir de film thermo-rétractable des lots de bouteilles. Une feuille de polyéthylène recouvre les bouteilles, lesquelles s'engagent dans un tunnel muni d'une soufflerie d'air chaud. Celui-ci provoque la rétraction du film et son collage léger autour des bouteilles.



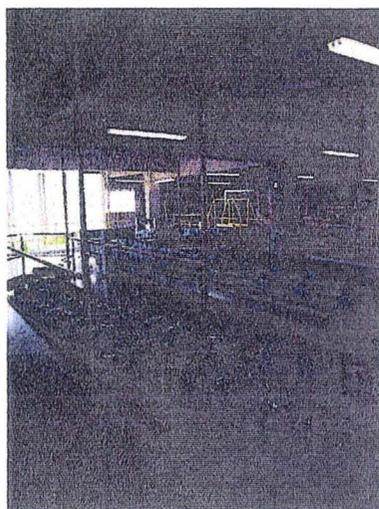
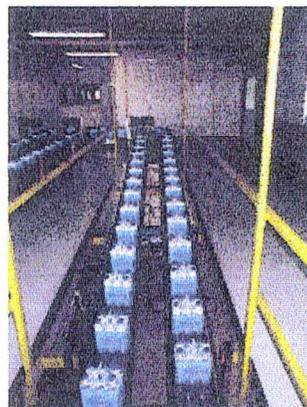


Photo X et X :
Les convoyeurs
de packs
Saint Amand.



Les lots de bouteilles fardelées ou en carton sont empilés sur des palettes en bois.

Cette palette est ensuite drapée avec une housse «anti-collante» pour éviter l'arrachage du film des packs

Ensuite la protection extérieure ainsi que le maintien des packs sont assurés, là encore, par un film rétractable. Cette opération se nomme le housage. Une gaine en polyéthylène, opaque ou non, parfois teintée et d'épaisseur notable recouvre la palette. Ensuite l'air chaud d'une rampe à gaz mobile ou un four électrique rétracte le film sur celle-ci.

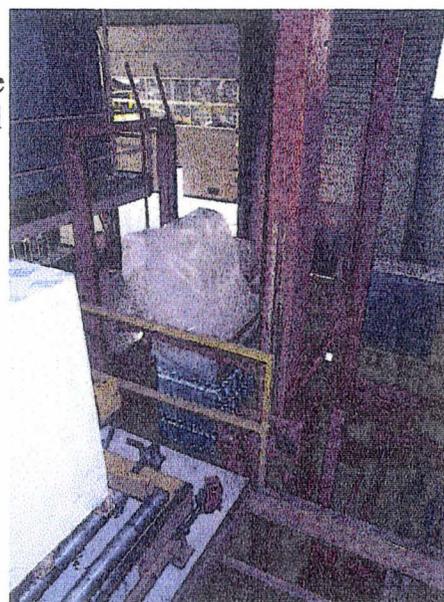
Les palettes ou casiers sont alors gerbés dans la zone d'entreposage de l'usine. Le convoyage vers le chargement de trains et de camions s'effectue à l'aide de chariots élévateurs.

Le transport et le stockage des lots échappent ensuite à la maîtrise de l'embouteilleur. Il faut dans ce cas prévenir des températures extrêmes : gel (éclatement des bouteilles) et fortes chaleurs. De plus, il faut éviter les contacts avec des molécules organiques auxquelles les plastiques sont perméables. Des recommandations de stockage au frais, à l'abri de la lumière et de l'humidité, figurent en clair sur l'emballage

- 3 Le remplissage
- Le rinçage
 - Le soutirage
 - Le bouchage
 - L'étiquetage et le datage

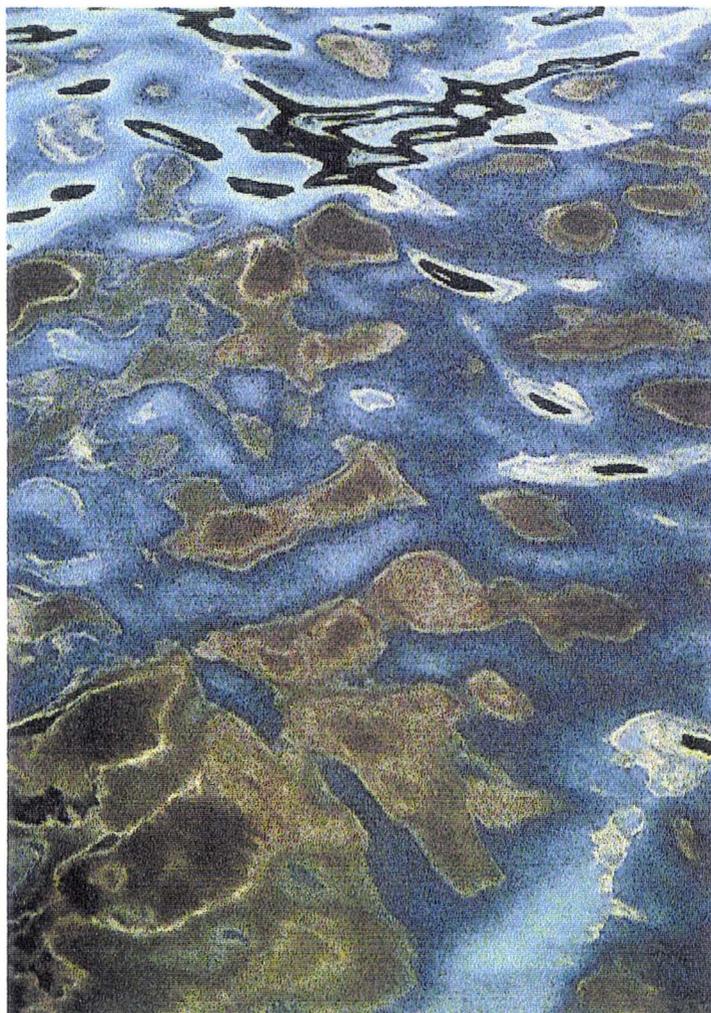
- 4 Le sur-conditionnement
- Le fardelage
 - La palettisation
 - Le drappage
 - Le housage
 - Le gerbage
 - Le transport et le stockage

Photo X :
La housseuse
Saint Amand



Les ouvrages utilisés pour la rédaction de ces généralités dont voici les auteurs -Auby 1994 ; Evina 1992 ; Pomerol 1992 ; Rachline 1996 ; Tampo 1992 ; Thuillier 1990- sont référencés dans la bibliographie.





INTRODUCTION

« Si un contemplatif se jette à l'eau, il n'essaiera pas de nager, il essaiera d'abord de comprendre l'eau. Et il se noiera. »

Henri Michaux (1899-1984) – Ibid., le portrait de A.

I/ Les eaux minérales

I.1/ Introduction

A l'approche du XXI^{ème} siècle, l'eau et l'environnement font figure de deux grands problèmes intimement liés à l'évolution de l'humanité. Seul 3% des 1,34 milliards de km³ d'eau recouvrant la Terre, sont considérés consommables. La majeure fraction contenant d'importantes quantités de sels minéraux s'avère impropre à la consommation des plantes et des animaux supérieurs qui possèdent un métabolisme inadapté à de tels apports nutritionnels. Avec une courbe démographique croissante et une altération de l'environnement, progressive et inhérente à cette dernière, l'homme s'inquiète de la réduction du capital d'eau douce à la disposition de son agriculture et de sa consommation propre. Des mesures sont entreprises dans ce but telles que la médiatisation récente des pollutions de la plus vaste réserve continentale que constitue le lac Baïkal et l'interdiction de toute exploitation minière sur le continent antarctique, autre masse considérable d'eau retenue dans ce cas sous forme solide.

Dans les sociétés où l'industrie, la technique et la science occupent une place centrale, la notion de mythologie apparaît archaïque et suscite des réactions négatives. La science a rompu l'ancienne alliance entre l'Homme et une Nature proprement vivante et douce de signification. Pourtant certains sociologues ne sont pas loin de penser que pour résoudre le problème de l'eau, il faut restituer à cet élément son caractère sacré (Thuillier 1990).

La France, pays des vins et des fromages, est aussi celui des eaux. La consommation des eaux embouteillées a beaucoup augmenté ces dernières années, d'une part du fait de la recherche d'une vie plus équilibrée et plus naturelle (modification des comportements), d'autre part du fait de l'accroissement du taux d'industrialisation et d'urbanisation (pollution). La raison de cette popularité pour les eaux minérales est en partie due à la perception des consommateurs. Venant d'une source naturelle, elle a des effets bénéfiques sur la nutrition, sur la médecine et a des propriétés thérapeutiques (Leclerc 1976; Merino 1976); pourtant elles ne sont pas correctement protégées à la source, et durant l'embouteillage et leur transport, elles sont sujettes à des contaminations (Geldreich *et al.* 1975 ; Warburton *et al.* 1986 ; Gonzalez *et al.* 1987a).

L'eau est le solvant biologique universel et la seule boisson physiologiquement indispensable à l'organisme (2 à 3 litres par jour dont 1 litre à 1,5 litre sous forme de boisson). La part relative de l'eau dans le corps humain varie avec l'âge et le sexe mais reste cependant importante (60% en moyenne).

Le rôle de l'eau dans l'organisme est considérable. L'eau intervient dans la régulation thermique, dans l'hydratation de la peau, dans la détoxification, le nettoyage de l'organisme. L'eau est un solvant (transport des vitamines hydrosolubles et des minéraux), un lubrifiant (paupières), un élément essentiel au maintien de la performance sportive et de la vigilance.



Figure 3 : Carte de distribution des eaux de boisson embouteillées (St Amand 1996).

I.2/ La nature et l'origine de la microflore des eaux minérales

Les bactéries identifiées dans la flore autochtone de l'eau de Vittel existent aussi dans les eaux de surface. Pourtant dans le cas d'une source bien protégée de par sa situation géologique comme celle de Vittel, il n'existe aucune raison de penser que ces bactéries proviennent de la surface. Au contraire, la constance au cours du temps de la taille de la population bactérienne autochtone, montre que nous avons à faire à un écosystème bactérien stable, dont l'équilibre est réglé par les conditions physico-chimiques du milieu où elles vivent, comme le démontrent les travaux de Ducluzeau *et al.* (1976 a).

D'après Fleet et Mann (1986), les contaminations ont rarement lieu au niveau de la source, d'autant qu'il existe des périmètres de protection autour de ces forages. Les sources de contamination sont principalement rencontrées sur l'équipement de pompage, de transport qui servent à l'acheminement de l'eau pour l'embouteillage, ainsi qu'au niveau des bouteilles, des bouchons et des équipements utilisés dans ce processus. L'exposition de l'eau à l'air et les contacts avec l'Homme et d'autres animaux durant l'embouteillage sont des modes supplémentaires de contamination (Leclerc 1976; Schmidt-Lorenz 1976).

D'autres auteurs s'intéressent à l'origine de la microflore des eaux embouteillées. Bischofberger *et al.* (1990), Manaia *et al.* (1990) montrent une composition distincte entre les eaux embouteillées et les eaux de griffon. L'article 5.3 de la Directive Communautaire Européenne requiert une même flore dans les bouteilles et dans l'eau du griffon ce qui n'est pas vérifié, malgré quelques études sur les eaux minérales, en France (Ducluzeau *et al.* 1976a), dans l'ouest sibérien (Tronova 1984) et en Espagne (Ramos-Cormenzana *et al.* 1980 ; Mosso-Romeo *et al.* 1981 ; de la Rosa Jorge *et al.* 1983). Il n'existe pas de rapports dans la bibliographie sur l'étude simultanée de la microflore des eaux du griffon et de celles embouteillées.

De plus on observe une introduction secondaire de bactéries détachées des parois de réservoirs, de couches bactériennes flottantes sur la surface de l'eau, de bio-films et d'incrustation sur les surfaces internes des conduites de distribution est notée. Ce phénomène est bien connu dans les containers et les conduites des eaux d'adduction (LeChevallier *et al.* 1987).

Avec de tels résultats, deux groupes de bactéries très différents d'origine et de caractéristiques dans la flore des eaux minérales naturelles sont définis: autochtone ou microflore spécifique du substrat et allochtone ou flore contaminante (Bischofberger *et al.* 1990).

Les bactéries autochtones sont la microflore naturelle de l'eau. Elles sont généralement psychrotrophes et oligotrophes, et elles peuvent se multiplier rapidement dans les eaux

embouteillées (Schmidt-Lorenz 1976). Cette multiplication est étudiée pour adapter la législation et vérifier la qualité organoleptique et microbiologique de l'eau (Buttiaux et Boudier 1960 ; Schawller et Schmidt-Lorenz 1980 ; Anon. 1985 ; Quevedo-Sarmiento *et al.* 1986 ; Hunter et Burge 1987).

Les bactéries allochtones, lesquelles sont des contaminants, apparaissent dans l'eau au cours de l'embouteillage. Cette flore contaminante peut être subdivisée en une flore de transit et une permanente (Schmidt-Lorenz 1976).

La flore contaminante en transit, constitue une population bactérienne délicate difficilement capable de croître dans l'eau minérale vouée à disparaître. Ces espèces telles que *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes*, *Streptococcus* deviennent des cellules viables non cultivables un à deux jours après leur inoculation dans des eaux minérales plates embouteillées (Buttiaux et Boudier 1960; Ducluzeau *et al.* 1976c; Schmidt-Lorenz 1976).

La flore contaminante permanente est constituée d'espèces oligocarbotolérantes capables de croître avec de très faibles quantités nutritives et rester viables durant de longues périodes. Des bactéries allochtones pathogènes, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, peuvent abaisser leur activité métabolique (Geldreich 1990); elles sont par conséquent, considérées comme des contaminants persistants (Schmidt-Lorenz 1976; Gonzalez *et al.* 1987b; Manaia *et al.* 1990 ; Morais et Da Costa 1990). Les bactéries à Gram négatif psychrotrophes sont les représentants les plus importants, avec en plus des espèces mésophiles comme *Klebsiella pneumoniae* et *P. aeruginosa* (Ducluzeau *et al.* 1976a). Gonzalez *et al.* (1987b) montrent que *P. aeruginosa* peut croître et rester viable dans l'eau minérale naturelle embouteillée même après 11 mois.

Leclerc (1994a) évalue la qualité des eaux minérales naturelles non pas avec deux classes mais trois catégories principales de marqueurs ou d'indicateurs: (1) Les premiers sont les bactéries hétérotrophes (oligotrophes) qui spécifient l'eau à la source puis dans la bouteille et que l'on pourrait appeler des indicateurs de spécificité biologique. D'autres expriment au contraire, une contamination et donc un risque éventuel pour le consommateur. (2) Les seconds concernent les bactéries contaminantes introduites dans l'eau au cours de son transport, de son stockage ou de son embouteillage; ce sont des indicateurs de contamination technologiques (Schmidt-Lorenz *et al.* 1983, 1987 ; Leclerc et Mossel 1985). (3) Les troisièmes sont les indicateurs de contamination fécale universellement utilisés dans le contrôle bactériologique de l'eau et des aliments. Le concept général est évidemment applicable au cas particulier des eaux minérales naturelles.

I.3/ Le métabolisme de ces bactéries

Pour accroître leur masse et se multiplier, les bactéries doivent trouver dans l'eau minérale les éléments nutritifs nécessaires: une source d'énergie, une source de carbone, d'azote et des éléments minéraux: phosphore, soufre, potassium, magnésium, manganèse, fer, calcium, sodium...

Selon une estimation de Leclerc (1994a), la quantité de matière oxydable utilisée par une cellule bactérienne initiale pour donner naissance à 10^7 bactéries filles est de 0,1 mg. La population bactérienne maximum d'un ml d'eau de Vittel étant cinquante fois moins abondante, on voit qu'elle n'a pas utilisé durant sa croissance plus de 0,01 µg/ml de matière oxydable, c'est-à-dire des traces difficilement appréciables. La question est de savoir si le métabolisme de ces bactéries dans l'eau minérale est strictement autotrophe, c'est-à-dire effectué à partir de substances purement minérale ou si au contraire ce faible développement correspond à l'utilisation de traces de matières organiques (Ducluzeau 1976).

Les principaux types métaboliques sont définis classiquement en fonction des composés donneurs d'électrons et des composés accepteurs d'électron. L'énergie des bactéries provient de l'oxydation des composés réduits (donneurs d'électrons) qui peuvent être organiques ou minéraux. L'oxydation est une perte d'électrons accompagnée d'une perte d'hydrogène. Les oxydations qui apportent l'énergie ne peuvent s'effectuer qu'en présence de composés accepteurs d'électrons qui seront réduits, c'est-à-dire qui vont s'enrichir d'un électron ou d'un hydrogène. Les composés qui peuvent être ainsi réduits sont, comme précédemment, organiques ou minéraux (HCO_3^- , SO_4^{2-} , Fe^{3+}) ou plus simplement l'oxygène.

L'aliment organique, source d'énergie, est en même temps la source de carbone obligatoire. De ce point de vue, les bactéries sont aussi appelées hétérotrophes, pour les opposer aux bactéries autotrophes qui, au contraire, peuvent utiliser le CO_2 de l'air comme seule source de carbone pour leur nutrition. On sait que les eaux minérales contiennent très peu de matières organiques: c'est la raison pour laquelle les bactéries de ces milieux sont souvent qualifiées d'oligotrophes pour traduire cette particularité. De plus, elle n'ont pas d'exigence en facteurs de croissance et de ce point de vue ce sont des prototrophes, contrairement aux bactéries auxotrophes qui elles, ont besoin pour se multiplier, de ces facteurs (acides aminés, bases puriques et pyrimidiques, vitamines).

Si nous analysons les constituants des eaux minérales naturelles, nous observons que les donneurs d'électrons ne peuvent être que des substances organiques tandis que l'accepteur d'électrons ne peut être que l'oxygène. Les seules bactéries susceptibles de se multiplier

appartiennent donc aux organotrophes aérobies. D'une façon générale, les bactéries de l'environnement aquatique, tellurique, doivent avoir le moins d'exigences possibles pour se multiplier. Dans les eaux minérales, la pauvreté en éléments nutritifs ne permettra la croissance que de bactéries nécessairement prototrophes. Par opposition, les bactéries adaptées à l'homme et qui vivent en symbiose ou en parasitisme, se sont créées au cours de cette adaptation des dépendances nutritionnelles de plus en plus fortes. A cet égard, la plupart des bactéries dites pathogènes pour l'homme ont des exigences nutritionnelles élevées et des besoins spécifiques en facteurs de croissance (Leclerc 1994a).

I.4/ L'évolution de la microflore des eaux de forage et embouteillées

L'eau, dans la nature, n'est jamais totalement stérile (Schwaller et Schmidt-Lorenz 1980). Dans la nappe souterraine de la source, l'eau en mouvement constant contient toujours, en quantité variable mais limitée, un certain nombre de germes ne dépassant que rarement le nombre de 1 à 10 par ml. Lorsque cette eau est captée et mise dans des récipients et des bouteilles, ou lorsqu'elle stagne un certain temps dans des conduites de distribution, elle passe dans un système fermé en "vase clos". Alors les bactéries oligocarbotolérantes et oligocarbofiles présentes commencent à croître comme dans une culture statique. Ceci est typique des eaux pauvres en nutriment comme les eaux de rivières, de mer, de boisson, desionisées ou distillées (Bischofberger *et al.* 1990). Dans chaque système où l'eau stagne, une prolifération rapide de la flore bactérienne pouvant alors dépasser 10^5 germes par ml se produit après quelques jours.

L'analyse microbiologique des eaux minérales à l'émergence révèle toujours la présence de quelques bactéries cultivables (Leclerc 1994a). Après l'embouteillage, ce nombre évolue normalement pour atteindre en quelques jours, selon les cas, de 10^3 à 10^5 bactéries/ml. Buttiaux et Boudier (1960) sont les premiers à décrire ce phénomène. Depuis, quelques auteurs, Ducluzeau (1976a), Ducluzeau *et al.* (1976, 1977), Schwaller et Schmidt-Lorenz (1980, 1981), tentent de l'analyser. Les cinétiques de croissance varient en fonction de nombreux facteurs: nature de la source, pression d'oxygène, taux de matière organique, pH, rH, type de conditionnement, augmentation de la surface fournie par la bouteille (Fleet et Mann 1986) et méthodes de dénombrement (température, milieu...).

Ces observations sont soulignées par d'autres auteurs (Geldreich *et al.*, 1975; Schmidt-Lorenz 1976 ; Manaia *et al.* 1990 ; El-Zanfaly 1990). La flore bactérienne de l'eau minérale embouteillée augmente en nombre après l'embouteillage atteignant un pic au bout d'une semaine (Figure 4) (Yurdusev et Ducluzeau 1985 ; Gonzalez *et al.* 1987a ; Delattre *et al.*

1988; Bischofberger *et al.* 1990 ; Morais et Da Costa 1990). Après ce temps, le nombre de bactéries reste le même au moins 6 mois (Hunter 1993). Buttiaux (1960) dès 1960 montre également que les eaux minérales non gazeuses contenant moins de une bactérie aérobie (UFC/ml) cultivées à 22°C à la fin de leur conditionnement en flacon, en renferment de 10^3 à 2.10^5 et plus après 1 à 6 mois de séjour à la température ambiante.

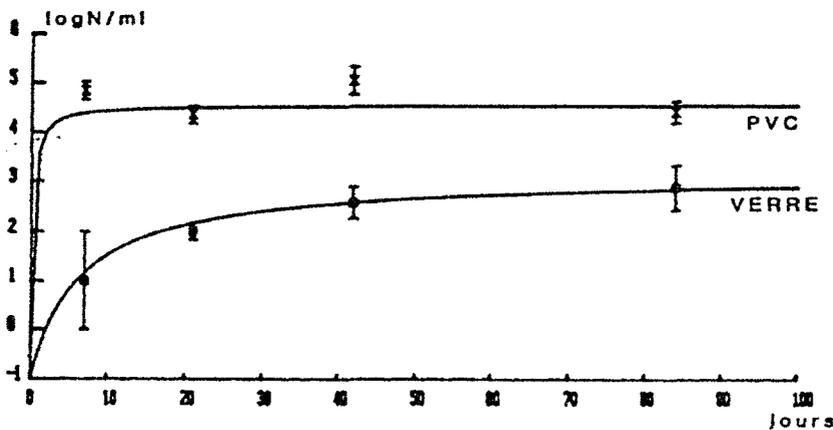


Figure 4 : Evolution de la microflore viable et cultivable de l'eau minérale embouteillée de la Grande Source, Vittel (Delattre *et al.* 1988).

Les bactéries indigènes peuvent survivre dans les eaux embouteillées pendant de longues périodes et il peut y avoir des croissances cryptiques de certaines espèces après mort et autolyse d'autres espèces, libérant de nouvelles ressources nutritives (Fleet et Mann 1986). Buttiaux et Boudier (1960) isolent des bactéries à un niveau de 10^4 - 10^5 cellules /ml dans trois échantillons d'eau minérale, lesquels avaient été embouteillés 50 ans auparavant, en 1910. Ce type de résultat montre à long terme, que les changements majeurs dans les populations bactériennes des eaux embouteillées reflètent les changements dans la disponibilité des nutriments, une baisse de viabilité des souches, les compétitions, les antagonismes ou d'autres facteurs encore incompris (Morais et Da Costa 1990).

Le matériel des contenants apparaît affecter la qualité microbiologique des eaux minérales naturelles (Fewtrell *et al.* 1997). Certaines études trouvent des numérations significativement plus basses dans des bouteilles en verre plutôt qu'en PVC (Del Vecchio et Fischetti 1972; De Filip *et al.* 1976; Yurdusev et Ducluzeau 1985 ; Gonzalez *et al.* 1987a ; Oger *et al.* 1987). La cause majeure des différences entre les numérations des bouteilles plastiques et en verre nettoyé est de façon évidente l'effet bactériostatique d'agents résiduels de nettoyage. A noter également, la dissolution des substances organiques de faibles poids moléculaires provenant des bouteilles plastiques qui pourraient favoriser la croissance dans ce type de

conditionnement. Ce phénomène, souvent établi comme une ressource secondaire de nutriments joue pourtant un rôle arbitraire au regard des résultats de Bischofberger *et al.* (1990).

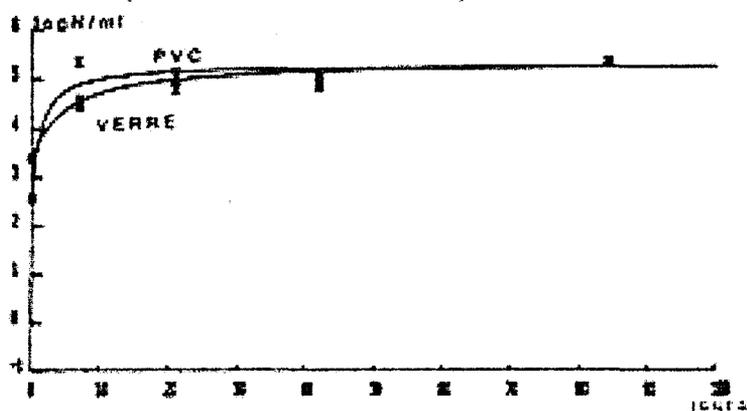


Figure 5 : Evolution de la microflore totale de l'eau minérale embouteillée de la Grande Source, Vittel (Delattre *et al.* 1988).

Cependant, d'autres études produisent des résultats en désaccord (Morais et Da Costa 1990; Mavridou 1992). Ces incohérences apparentes peuvent résulter du type ou de la marque des eaux embouteillées. De plus, les produits de nettoyage selon leur nature pourraient servir de nutriments pour certaines bactéries.

Dans des investigations antérieures, le potentiel de diffusion d'oxygène dans les bouteilles plastiques est également discuté (Schmidt-Lorenz 1976). Pourtant aucune différence mesurable n'est décelée après stockage, entre les bouteilles plastiques et celles en verre (Bischofberger *et al.* 1990).

En addition du type de matériau, la couleur du contenant apparaît également affecter les numérations de colonies, avec généralement des résultats plus élevés à 37°C dans les bouteilles colorées en verre et en plastique comparées aux transparentes. Cette différence peut être due à l'effet protecteur de la coloration vis-à-vis des UV. Récemment des auteurs (Barcina *et al.* 1990 ; Davies et Evison 1991 ; Arana *et al.* 1992 ; Curtis *et al.* 1992 ; Gourmelon *et al.* 1994 ; Monfort et Baleux 1994) montrent que la lumière accélère la perte de cultivabilité et la formation de bactéries entériques actives mais non cultivables dans le système aquatique. L'effet négatif de la lumière est dû à la production de formes réactives de l'oxygène, principalement du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyls (Davies et Evison 1991 ; Curtis *et al.* 1992).

L'activité antibactérienne du dioxyde de carbone dans l'eau est connue (Koser et Skinner 1922). Il est démontré qu'il induit une chute du pH, associée à l'acide carbonique (King et Nagel 1967).

Les résultats concernant la température sont contradictoires. Des auteurs (Smith et al. 1994 ; Oliver *et al.* 1995) montrent que des températures basses font décroître la survie, alors que d'autres détectent une augmentation (Barcina *et al.* 1986 ; Rollins et Colwell 1986 ; Korhonen et Martikainen 1991 ; Sorensen 1991).

Les quelques matières organiques de l'eau qui serviraient de nutriments sont visiblement adsorbées sur la surface interne de la bouteille et deviennent plus accessibles. Cette accessibilité s'améliore avec l'augmentation du ratio aire de la surface/volume (Zobell et Anderson 1936). C'est pourquoi les numérations pourraient dépasser les 10^6 UFC/ml dans les petites bouteille ($S/V=3/1$) comparées à seulement 10^5 UFC/ml dans les bouteilles plus grandes de 1 litre ($S/V=0,6/1$) (Schmidt-Lorenz *et al.* 1990).

1.5/ L'identité des bactéries des eaux minérales

Les nappes sont relativement peu accessibles du fait de leur géographie. Leur géologie, hydrologie, chimie, écologie et microbiologie sont différentes de celles des systèmes en surface. Malgré tout, plusieurs études sont conduites sur la population microbienne des aquifères (Balkwill et Ghiorse 1985 ; Bone et Balkwill 1988 ; Ghiorse et Wilson 1988 ; Hobel-Boelke *et al.* 1988a, 1988b ; Balkwill 1989 ; Balkwill *et al.* 1989 ; Madsen et Bollag 1989 ; Sinclair et Ghiorse 1989 ; Fredrickson *et al.* 1991).

1.5.1/ L'eau de griffon

Les eaux minérales naturelles ne sont pas stériles et les échantillons prélevés à la source montrent des numérations bactériennes entre 1 à 100 UFC/ml. Ces bactéries représentent la flore microbienne indigène ou autochtone. Différents auteurs analysent et dénombrent très tôt cette population microbienne originelle (Buttiaux et Boudier 1960 ; Ducluzeau *et al.* 1976a ; Leclerc 1976).

Plusieurs études sont publiées sur la flore bactérienne des eaux minérales autres que celles embouteillées. Dans ces sources, des bactéries aérobies à Gram négatif sont largement rencontrées (Schwaller *et al.* 1980, 1981 ; Oger *et al.* 1987 ; Manaia *et al.* 1990 ; Guillot et Leclerc 1993 ; Hunter 1993), comme dans les flores isolées des eaux souterraines (Chapelle *et al.* 1988 ; Balkwill 1989 ; Madsen and Bollag 1989 ; Chapelle et Lovley 1990).

Elles sont classées pour la plupart dans le genre *Pseudomonas* (De Vos et De Ley 1983 ; De Ley 1992; Saint-Onge *et al.* 1992; Willems *et al.* 1992), *Comamonas* (De Vos *et al.* 1985; Tamaoka *et al.* 1987), *Brevundimonas* (Segers *et al.* 1994), *Sphingomonas* (Yabuuchi *et al.* 1990) et moins fréquemment *Stenotrophomonas* (Palleroni et Bradhury 1993), *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.* 1992) et *Acinetobacter*. Le genre *Pseudomonas* apparaît être particulièrement commun dans les eaux souterraines à cause de son extraordinaire souplesse vis-à-vis de ses besoins organiques pour se développer. *Pseudomonas* du groupe *fluorescens* sont les plus largement distribués dans ces eaux. Des membres des autres genres tels que *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Janthinobacterium* et *Chromobacter* (Schwaller et Schmidt-Lorenz 1981 ; Gonzalez *et al.* 1987a ; Bischofberger *et al.* 1990 ; Manaia *et al.* 1990; Mavridou 1992) sont aussi isolés. Ils constituent tous des représentants des bactéries aérobies, Gram négatives non fermentatives (bacille ou coque). Dans certains cas des bactéries du groupe *Sphaerotilus-Leptothrix* et des genres *Caulobacter* et *Hyphomicrobium* ont été rencontrées fréquemment (Gonzalez *et al.* 1987a) ou plus rarement (Morais et Da Costa 1990).

Les bactéries à Gram positif les plus communément isolées dans les eaux minérales incluent les genres *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* et *Staphylococcus* (Hunter et Burge 1986 ; Gonzalez *et al.* 1987a ; Bischofberger *et al.* 1990 ; Mavridou 1992). Ces bactéries semblent largement présentes dans les sources des eaux minérales thermales (De Los Angeles Mosso *et al.* 1994).

Chaque eau possède son «empreinte digitale» (Schwaller et Schmidt-Lorenz 1981) ou son «empreinte biologique» (Leclerc 1994a). En effet, nous rencontrons une diversité ainsi qu'une proportion des genres variant d'une eau de griffon à l'autre.

Fewtrell (1997) montre dans ses études qu'environ 2% des échantillons d'eau minérale examinés ne rentrent pas dans les normes microbiologiques. *E. coli* et Streptocoques fécaux ne sont pas isolés, mais *P. aeruginosa* est rencontré dans ces échantillons. D'autres auteurs isolent également *P. aeruginosa* (Richards *et al.* 1992 ; Rosemberg 1990). Des études antérieures (Hunter et Burge 1987; Havelaar *et al.* 1990) ne révèlent pas de souches appartenant au genre *Aeromonas* dans les eaux, elles seraient inhibées par la flore autochtone d'après Havelaar *et al.* (1994). Quevedo-Sarmiento *et al.* (1986) retrouvent pourtant de telles souches.

1.5.2/ Les eaux en bouteille

Les eaux minérales embouteillées plates possèdent un nombre élevé de bactéries cultivables hétérotrophes, car les procédés de désinfection ou de stérilisation ne sont pas autorisés. La population bactérienne des eaux minérales est diverse et dépend de la nature de l'eau. Ces populations incluent les espèces déjà rencontrées au niveau des forages: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Caulobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* (Mosso *et al.* 1985 ; Manaia *et al.* 1990 ; Guillot et Leclerc 1993 ; Leclerc 1994a) et parfois des bactéries ferrugineuses (Gonzalez *et al.* 1987a). D'autres auteurs rapportent la présence de moisissures, avec une prédominance du genre *Penicillium*, suivi des genres *Acremonium* et *Cladosporium* (Fujikawa *et al.* 1997).

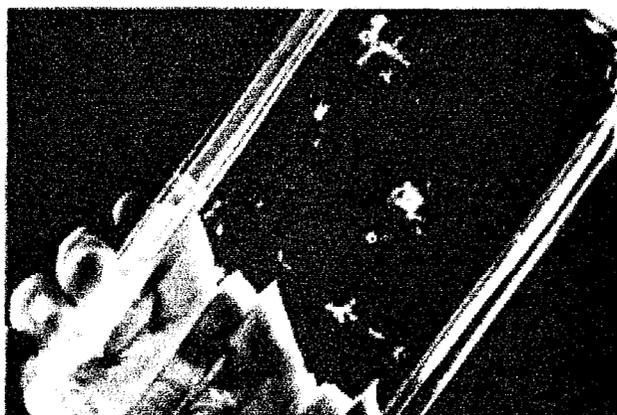


Photo 7 : Exemple de contamination fongique dans une eau minérale embouteillée, d'après Fujikawa *et al.* (1997).

En ce qui concerne les protozoaires, une étude se rapportant à trois eaux minérales mexicaines, révèle des espèces très variées, trouvées après filtration de 20 litres (Riveira *et al.* 1981). Il s'agit de *Naegleria gruberi*, *Acanthamoeba astronyxis*, *Vahlkampfia vahlkampfi* et *Bodonomorpha minima*. Aucun de ces protozoaires n'est associé à des infections humaines.

Une autre étude, en Egypte, rapporte des genres d'algues très variés dans les eaux douces embouteillées (El-Zanfaly 1990). Les genres d'algues vertes incluent *Ankistrodesmus*, *Staurastrum*, *Eudorina*, *Oocystis*, *Scenedesmus*, *Tetraedon* et *Actinastrum*. Les genres des cyanobactéries incluent *Cylindrospermum*, *Agmenellum* et *Anabaena*. Les Diatomées présentes étaient des *Melosira*, *Bacillaria*, *Synedra* et *Cyclotella*.

I.6/ Les méthodes d'identification de ces bactéries

L'identification des bactéries présentes à l'émergence et qui peuvent se développer dans l'eau embouteillée pose de réels problèmes, mis en lumière il y a déjà une dizaine d'années par Schwaller et Schmidt-Lorenz (1980, 1981). Les travaux de Quevedo-Sarmiento *et al.* (1986), Gonzales *et al.* (1987a), puis plus récemment encore, ceux de Morais et Da Costa (1990) et Manaia *et al.* (1990) confirment ces difficultés d'identification. Les bactéries aquicoles sont, pour la plupart, mal connues. Leur identification précise exige des études taxonomiques de longue haleine, comparables à celles qui ont été développées dans le domaine des Enterobacteriaceae au cours des quinze dernières années. Il n'est donc pas surprenant que le pourcentage des souches identifiées avec un haut degré de probabilité ne dépasse pas actuellement 20% (Leclerc 1994a).

La caractérisation des bactéries des eaux minérales est difficile et trompeuse, et les isolats sont rarement identifiés au niveau de l'espèce (Ferreira *et al.* 1996). De plus, il n'y a pas de méthodes de référence pour l'identification et la caractérisation de ces micro-organismes. Quelques groupes de tests biochimiques simplifiés sont suggérés pour leur identification (Spino 1985 ; Holmes *et al.* 1986), mais la plupart des isolats des aquifères profonds sont seulement caractérisés physiologiquement par différents systèmes rapides d'identification. Cependant, ces systèmes d'identification rapide sont développés pour les espèces pathogènes et l'identification échoue souvent pour les isolats de l'environnement (Balkwill *et al.* 1989 ; Fredrickson *et al.* 1991 ; Amy *et al.* 1992).

Les caractères phénotypiques dépendant des activités physiologiques sont apparues moins importantes que les informations génétiques, du fait que les métabolismes peuvent être induits ou réprimés par différentes conditions environnementales. Les profils de restriction de fragments polymorphes (RFLP) de régions d'ADNr (ribotypage) constituent par conséquent, une méthode plus acceptable pour tester la diversité génétique des bactéries associées aux eaux minérales. L'utilisation de la biologie moléculaire pour l'identification est alors requise (Kampfer *et al.* 1996 ; Stackenbrandt 1997). Pour la première fois l'identification par les profils de restriction des gènes ARNr a révélé une remarquable spécificité de la flore bactérienne de quatre marques d'eau embouteillée (Guillot et Leclerc 1993).

Ferreira *et al.* (1996) proposent également l'analyse numérique des profils protéiques sur électrophorèse d'un large nombre de souches bactériennes. Celle-ci a permis la construction d'une banque de données qui permet la mise en évidence des modifications dans l'aquifère ou le système d'embouteillage par l'apparition de souches non habituellement rencontrées dans la flore autochtone. De plus, le contrôle du système d'embouteillage durant 6 mois a permis

de montrer la stabilité et les caractéristiques spécifiques de la microflore de l'eau minérale étudiée.

Les profils d'acides gras (Lambert *et al.* 1983 ; Boe et Gjerde 1980 ; Jänse 1991 ; Toshi Kameda 1991 ; Stead 1992), de protéines (Alexander *et al.* 1984; Vauterin *et al.* 1992), d'activité enzymatique (Kämpfer *et al.* 1992), d'antibiorésistance, et les études extensives des caractères phénotypiques sont également utilisés pour une identification plus précise. Dans ce dernier cas, il existe plusieurs systèmes d'identification sur le marché, tels que les galeries API (bioMérieux), les galeries BBL crystal (Becton Dyckinson) et les galeries BIOLOG (AES). Elles déterminent un grand nombre de caractères biochimiques (21, 30 et 96 respectivement) ; comme des tests de recherche enzymatiques, d'assimilation et de fermentation. Conçues dans un premier temps pour la microbiologie médicale, elles sont aujourd'hui très largement utilisées pour la microbiologie environnementale. Ainsi, nous les rencontrons dans les études d'identification des bactéries marines (Breschel 1992 ; Tan 1997), des bactéries cliniques (Wauters 1995), des bactéries du sol (Wünsche et Babel 1996), de *Pseudomonas* (Grimont *et al.* 1996), d'*Acinetobacter* (Bernards 1995).

1.7/ L'innocuité de la microflore des eaux minérales

1.7.1/ La microflore

La présence d'une microflore normale, dans une eau conditionnée, constitue la garantie de son caractère naturel, c'est-à-dire qu'elle n'a pas été traitée et qu'ainsi une éventuelle contamination antérieure n'a pas été masquée. Cette obligation lui procure la qualité d'être exempte de sous-produits de désinfection et en particulier de trihalométhanes dont on discute depuis vingt ans le pouvoir cancérogène (Craun 1993). Il est largement montré que cette flore représente une défense naturelle contre une contamination microbienne (effet inhibiteur des bactéries dominantes de la flore autochtone).

Des études prouvent la totale innocuité de cette flore autochtone, en particulier chez les nouveau-nés (eau de biberon) (Leclerc et Da Costa 1998). Elle est totalement inadaptée au développement dans l'organisme humain sain: elle est banale et non pathogène (Monnerot 1994). Ces particularités physiologiques et nutritionnelles ont des implications importantes. Ces micro-organismes ne peuvent théoriquement se développer dans le tube digestif de l'homme ou des animaux à sang chaud car même s'ils parviennent à franchir la barrière gastrique, à surmonter les mécanismes de cytoprotection intestinale (motricité, mucus, et glycocalyx) ils ne pourront entrer en compétition favorable avec les flores résidentes qui se

multiplient de façon optimale à la température de 37°C et qui se sont adaptées à un environnement nutritionnel spécifique (Leclerc 1994b; Leclerc et Da Costa 1998).

Hunter (1993) analyse longuement les aspects microbiologiques des eaux minérales et leur relation avec la santé. Du point de vue microbiologique, les eaux minérales pourraient être théoriquement vulnérables au travers des technologies nécessaires à leur captage, leur transport et leur embouteillage. En effet, certaines contaminations sérieuses comme *Giardia*, *Cryptosporidium* et des virus entériques sont envisageables. Il y a des épidémies de *Giardia* causées par la contamination d'eau souterraine (Craun 1986). Bien qu'aucune épidémie de ce genre ne soit liée à l'eau minérale, plusieurs auteurs isolent des entérovirus dans des eaux souterraines et de source (Hurst 1991). Les virus, tels que l'hépatite A et le poliovirus montrent une survie importante, plus de 120 jours, dans des eaux minérales embouteillées (Biziagos *et al.* 1988). Il existe donc réellement un potentiel de contamination des eaux minérales par ce genre de micro-organismes.

Il apparaît pourtant que ce "challenge" est maîtrisé et que la pureté originelle de l'eau minérale naturelle pourrait être intégralement transposée dans son contenant. Les données épidémiologiques en apportent la preuve. Depuis l'existence de la réglementation européenne qui date de 1980, aucune épidémie, ni aucun cas infectieux dû à la consommation d'eau minérale naturelle n'est rapporté dans la littérature, ni enregistré par les autorités sanitaires des différents pays. Il faut pourtant signaler leur mise en cause au cours de la grave épidémie portugaise de choléra, rapportée et analysée par Blake *et al.* (1977) et qui est responsable de 2467 cas documentés et de 48 morts.

1.7.2 Les caractéristiques de virulence des bactéries

D'après Leclerc et Da Costa (1998), Edberg *et al.* (1997), le développement d'infection est corrélé avec trois paramètres: le nombre de microbes et l'organe cible; les caractéristiques de virulence du micro-organisme, et le statut immunitaire de l'hôte et l'organe cible (Duncan et Edberg 1995). Plusieurs études ont conduit à des tests sur l'activité invasive ou cytotoxique des eaux embouteillées sur des lignées de cultures cellulaires (Lye et Dufour 1991; Payment *et al.* 1994; Edberg 1996; Edberg *et al.* 1996). Dans tous les cas, un faible pourcentage (1 à 2%) de bactéries examinées étaient cytotoxiques. Payment *et al.* (1994) ont étudié la cytotoxicité de bactéries hétérotrophes cultivables sur milieux contenant du sang incubé à 35°C, afin de mimer les conditions physiologiques humaines. Un fort pourcentage d'isolats cytotoxiques appartenait au genre *Bacillus*, lequel peut être corrélé à de petite gastroentérites. Les risques de la santé étaient estimés par la détermination de la cytotoxicité

et de l'invasion dans la lignée d'entérocytes humains. Seuls Edberg *et al.* (1997) ont étudiés des bactéries hétérotrophes cultivables des eaux embouteillées. Plus de 95% de ces bactéries ont montré une faible invasivité et cytotoxicité. Les données expérimentales montrent que les bactéries autochtones des eaux minérales n'ont jamais apporté de désordres chez l'Homme et l'animal, *in vitro*, sont incapables de directement endommager des cellules humaines dans des cultures tissulaires. Depuis l'existence des réglementations européennes de 1980, aucune épidémie ou cas ponctuel de maladie inhérent à la consommation d'eau minérale naturelle n'a été rapporté dans la littérature, ou par les autorités sanitaires des états de la communauté européenne.

1.7.3/ La multi-résistance aux antibiotiques de cette microflore

La résistance des bactéries de l'environnement aux antibiotiques est reconnue depuis longtemps (Cooke 1976; Sizemore et Colwell 1977). De nombreux auteurs isolent de telles souches dans les eaux de surface (Kelch et Lee 1978 ; Saye *et al.* 1987 ; O'Morchoe *et al.* 1988), des estuaires (Allen *et al.* 1977; Parveen *et al.* 1997), des stations d'eau potable (Lamka *et al.* 1980), des eaux naturelles (Gauthier *et al.* 1981; Luli *et al.* 1983), de lacs (Bedard *et al.* 1982), d'eaux résiduaires (Bell *et al.* 1983; Morozzi *et al.* 1988 ; Morinigo *et al.* 1990) et d'environnements hospitaliers (Arturo-Schaan *et al.* 1996). Ces micro-organismes s'avèrent souvent multirésistants, et apparaissent aux yeux de certains investigateurs, comme progressivement communs du fait de l'utilisation explosive d'antibiotiques en médecine, en alimentaire et en agriculture à travers le monde entier (Grabow *et al.* 1974 ; Krcme'ry *et al.* 1989).

Ces dernières années, nous observons une consommation accrue des eaux embouteillées dans le monde entier (Warburton *et al.* 1986; Duquino et Rosenberg 1987). Des raisons variées contribuent à cet essor, telles que les fortes teneurs en fluorures, chlorures et la présence d'odeur et de goûts dans les eaux municipales, ou bien encore des contaminations possibles de l'eau d'aquifère par des déchets industriels (Geldreich *et al.* 1975; Tobin 1984). Comme les eaux embouteillées sont fréquemment issues de sources souterraines, elles sont perçues comme étant de bonne qualité. Pourtant, plusieurs auteurs (Duquino et Rosemberg 1987; Rosemberg et Duquino 1989 ; Hunter *et al.* 1990 ; Massa *et al.* 1995) mettent en évidence des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux minérales. Leurs recherches sont toutefois limitées et fragmentées.

La microflore des eaux minérales est constituée généralement de bacilles Gram négatif non fermentant, tel que les genres *Pseudomonas* (Duquino et Rosemberg 1987 ; De Vicente *et al.*

1990), *Moraxella* (Washington 1969 ; Pedersen *et al.* 1970), *Acinetobacter* (Pinter et Kantor 1973 ; Nagy et Csatory 1974 ; Breuil *et al.* 1975), *Flavobacterium* (Altmann et Bogokovsky 1971; Le François et Baum 1976), *Alcaligenes...* caractérisés comme résistants aux antibiotiques

Cette résistance constitue un intérêt scientifique pour plusieurs raisons: la thérapie, les marqueurs de résistance fournissant des outils dans la science fondamentale, elle peut également être utilisée comme outil taxonomique (Gilardi 1971 ; Philippon *et al.* 1989; Bizet et Bizet 1995 ; Campeau *et al.* 1996).

Le fait de découvrir de tels micro-organismes dans l'eau d'alimentation alerte certains auteurs (Al Jebouri 1985 ; Hunter *et al.* 1990 ; Fernandez-Astorga *et al.* 1992 ; Campeau *et al.* 1996). En effet, les genres rencontrés sont liés à de sérieux signes cliniques et symptômes (Anstey *et al.* 1991 ; Smith *et al.* 1993 ; Colding *et al.* 1994). La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques chez les sujets traités avec des antibiotiques, peut également conduire à une colonisation intestinale de ces bactéries lesquelles ont alors un avantage sélectif sur la microflore normale. De plus, la résistance peut être transférée via le plasmide facteur-R d'une bactérie à l'autre (Hunter *et al.* 1990). Les bactéries résistantes aux antibiotiques portant ce plasmide sont isolées de puits non traités et d'eaux de surface traitées (Armstrong *et al.* 1981), d'eaux résiduaires (Shaw et Cabell 1980), de rivières (Kelch et Lee 1978), de lacs (Jones *et al.* 1986) et d'autres types d'eau (Niemi *et al.* 1983 ; Sokary *et al.* 1988 ; Hassani *et al.* 1992).

1.7.4/ L'effet de barrière

L'information concernant la capacité de survie des indicateurs de contamination fécale et des bactéries pathogènes dans divers habitats aquatiques est cruciale pour la santé publique pour l'évaluation des risques potentiels. *Escherichia coli*, les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les anaérobies sporulés sulfite-réducteurs sont utilisés comme indicateurs de la qualité de l'eau et l'absence de ces bactéries sous forme cultivable est une indication de bonne qualité (Anon. 1980).

L'eau embouteillée minérale n'est pas soumise à des traitements antibactériens et est souvent stockée pendant plusieurs mois avant d'être distribuée et vendue. Il est par conséquent important d'être informé sur la survie de ces bactéries tests dans l'eau minérale, afin d'estimer la signification sanitaire de ces indicateurs (Leclerc et Da Costa 1998).

L'eau embouteillée peut être occasionnellement contaminée avec des bactéries; certaines pathogènes, d'autres indicateurs de contamination fécale ou de surface. Bien que l'aquifère des eaux minérales peut être contaminée, c'est le système d'embouteillage qui constitue la

plus grande source de contamination. Les directives CE (Anon. 1980) recommandent le contrôle de la qualité microbiologique des eaux minérales immédiatement après embouteillage. Parmi d'autres considérations, ceci serait le meilleur moment pour détecter les bactéries indicatrices et les bactéries pathogènes à cause de la mortalité présumée de certains de ces micro-organismes dans l'eau embouteillée. De plus, le dénombrement élevé sur boîte de Pétri des bactéries autochtones après stockage des eaux embouteillées peut interférer avec la détection des indicateurs de pollution fécale (Geldreich *et al.* 1975 ; Lamka *et al.* 1980).

Une eau minérale plate contient à l'émergence un petit nombre de bactéries (<10 UFC/ml). Cette flore croît rapidement après embouteillage et le nombre de micro-organismes se multiplie jusqu'à plusieurs dizaines de milliers par ml en 3 à 5 jours (Schmidt-Lorenz 1976 ; Yurdusev et Ducluzeau 1985). L'expérience montre que cette croissance atteint dans plus de la moitié des cas (66%) un taux compris entre 10^3 - 10^4 et dans la presque totalité des cas (96%) un taux inférieur à 10^5 (Leclerc 1994a). Les espèces présentes dans l'eau minérale sont généralement inoffensives (Buttiaux 1960; Buttiaux et Boudier 1960; Leclerc 1994b ; Vachée *et al.* 1997 ; Leclerc et Da Costa 1998).

On a souvent comparé cette flore autochtone de l'eau minérale aux communautés microbiennes de l'homme (biocénose) qui peuplent naturellement l'intestin, la bouche, la peau, etc... Ces communautés sont étroitement dépendantes des tissus et de leurs constituants au niveau desquels elles se développent. Elles occupent en quelque sorte le terrain et forment des barrières qui s'opposent à la pénétration des espèces étrangères éventuellement pathogènes. Ces effets de barrière ont été mis en évidence puis largement décrits par Ducluzeau et Raibaud (1979) dans le cas particulier de la flore intestinale. Bien que les mécanismes soient loin d'être clairement établis, il apparaît expérimentalement que ces effets de barrière jouent un rôle essentiel dans la défense anti-infectieuse de l'organisme. On pourrait ainsi admettre qu'à l'image de ces biocénoses humaines la flore bactérienne de l'eau minérale puisse, en occupant le milieu et en utilisant les éléments nutritionnels de ce milieu, empêcher la croissance de bactéries étrangères ou allochtones susceptibles de la contaminer. Sur le plan théorique cette hypothèse a les plus grandes chances d'être exacte. On imagine mal, en effet, comment par exemple des *E.coli*, *Salmonella* ou *Shigella* contaminants fécaux bien connus, et le plus souvent auxotrophes, pourraient se multiplier dans un milieu aussi pauvre et ne comprenant aucun des facteurs de croissances nécessaires. Ainsi, Lucas et Ducluzeau (1990) montre une décroissance plus marquée d'un inoculum d'*E.coli* dans une eau minérale Vittel pourvue de sa flore bactérienne que dans une même eau stérilisée. Cet

effet antagoniste de l'eau sur *E. coli* varie avec l'âge des entérobactéries inoculées, mais ne paraît pas lié, ni à la durée de conservation de l'eau, ni à la taille initiale de sa flore autochtone, ni au type de bouteille utilisée pour la conserver. Pour Ducluzeau *et al.* (1984), le mécanisme de l'effet inhibiteur pourrait être attribué à une substance inhibitrice accumulée dans l'eau durant les cycles successifs de croissance et de lyse de la population de bactéries autochtones. De plus, cette inhibition serait fonction de la nature de ces micro-organismes, plus ou moins actifs.

Pourtant des bactéries contaminantes (de type fécal) introduites accidentellement, même si elles ne se multiplient pas, ce qui est l'hypothèse la plus probable, peuvent néanmoins survivre et constituer un risque pour le consommateur. Il est intéressant d'analyser ce type de situation et d'étudier le comportement des deux catégories de micro-organismes mises en jeu, d'une part la souche contaminante, d'autre part la flore autochtone.

Il est observé que la contamination par des bactéries indicatrices de pollution fécale (*E. coli*, coliformes fécaux) et de bactéries pathogènes (*P. aeruginosa*) au sein des eaux minérales embouteillées avait une faible incidence sur la microflore originelle des eaux minérales. En effet, la contamination disparaissant plus ou moins rapidement, la population bactérienne initiale semble jouer le rôle de barrière face à leur colonisation au sein des bouteilles.

1.8/ L'origine des bactéries des sous-sols.

Dès les années 1920, Fredrickson et Tullis-Onstott (1996) rapportent les premiers indices d'une vie microbienne à des centaines de mètres sous la surface. En 1987, des géobiologistes trouvent des espèces variées de micro-organismes vivant sous le site de Savannah river, à des profondeurs atteignant 500m. Les bactéries du sous-sol sont présentes jusqu'à des profondeurs de 2,8 kms. Si la pression a peu d'effet direct sur les micro-organismes (même à plusieurs kilomètres de profondeurs), l'échauffement de la terre, lui, devrait limiter la profondeur à laquelle la vie souterraine peut subsister. La richesse de la vie dans le sous sol profond ne dépend pas uniquement des températures supportables, mais aussi de la qualité du milieu. Les micro-organismes doivent d'abord trouver de l'eau et de l'espace, dans les interstices rocheux. Ils doivent aussi trouver des éléments nutritifs afin de synthétiser leurs constituants cellulaires, notamment l'ADN et les protéines. Enfin, le milieu doit fournir l'énergie nécessaire à l'activité cellulaire. La variété des bactéries souterraines est grande. Neuf milles souches provenant de divers milieux souterrains sont jusqu'ici conservées et

cataloguées; certaines dégradent des composés organiques toxiques, d'autres produisent des antibiotiques, des enzymes thermostables ou de nouveaux pigments... (Fredrickson et Tullis-Onstott 1996).

Les écosystèmes terrestres paraissent contenir dans la plupart des cas, des communautés microbiennes oligotrophes (Chapelle et Lovley 1990 ; Stevens 1995). La flore bactérienne des sols et des eaux souterraines comprend des bactéries à Gram-positif des genres *Bacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* (Wilson *et al.* 1983) et des bacilles à Gram-négatif des genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Sphingomonas*, *Variovorax* (Balkwill *et al.* 1997 ; Jain *et al.* 1997). Wilson *et al.* (1983) montrent dans les aquifères peu profonds d'Oklahoma, une dominance des coques à Gram-positif. Ils suggèrent que ces bactéries sont dominantes dans la microflore des aquifères, les Gram-négatif étant minoritaires (Balkwill et Ghiorse 1985). Pourtant au regard d'une riche et récente bibliographie, les aquifères s'avèrent davantage colonisées par des Gram-négatif, sur un plan qualitatif comme quantitatif (Beloin *et al.* 1988).

Les principaux facteurs de contrôle du transport des bactéries dépendent de la nature du substratum, des nutriments et de la cellule bactérienne. Le transport de bactéries à travers le milieu géologique peut être considéré comme gouverné par les réactions sorption-désorption (Harvey et Garabedian 1991 ; Lindqvist *et al.* 1994 ; Tan *et al.* 1994). De nombreux facteurs agissent sur les propriétés de sorption des milieux traversés, tels que le type de sol, la taille des grains, la quantité de matière organique et d'argile, la couche ferrique et la minéralogie (Scholl *et al.* 1990; Sharma et McInerney 1994). D'autres facteurs incluent la chimie du soluté, le pH, la force ionique et la présence de surfactants (Fontes *et al.* 1991 ; Gannon *et al.* 1991). Au delà de ces facteurs chimiques et physiques, des facteurs microbiologiques interviennent également sur ce transport. Cela concerne la viabilité cellulaire, le statut nutritionnel, la charge électrostatique sur la surface cellulaire, l'hydrophobicité, l'hydrophilicité, la taille et la forme cellulaire, la prédation, le parasitisme et le cycle cellulaire (Peterson et Ward 1989; Gannon *et al.* 1991; Camper *et al.* 1993; Wess *et al.* 1995; Lawrence et Hendry 1996). La plupart des bactéries chimiotrophes isolées de sédiments profonds sont métaboliquement oxydatives (plutôt que fermentatives), et peuvent assimiler diverses sources carbonées. Kölbel-Boelke *et al.* (1988a, 1988b), Balkwill (1989), Zengh et Kellogg (1994), montrent que la communauté microbienne à chaque profondeur, est très diverse et différente d'un niveau à l'autre.

III/ La survie des bactéries des environnements aquatiques

La survie des bactéries autochtones des systèmes aquatiques est affectée par des facteurs environnementaux biotiques et abiotiques (Barcina *et al.* 1997). La prédation par les protozoaires est un des principaux procédés biologiques qui contrôlent la densité bactérienne. Son étendue dépend de la concentration bactérienne et de la capacité digestive des prédateurs. L'état physiologique des bactéries est affecté par de multiples stress physico-chimiques lesquelles répondent en entrant dans un état dormant viable non cultivable. Les bactéries carencées montrent une tendance au rapetissement et une résistance généralement accrue à la chaleur, aux chocs oxydants et osmotiques. La rareté des nutriments, la température, le stress osmotique et la lumière visible semblent être les facteurs abiotiques ayant les influences les plus négatives. L'effet négatif de la lumière sur la cultivabilité des entérobactéries dans les systèmes aquatiques est depuis longtemps reconnu. Des auteurs rapportent que les souches portant des plasmides, peuvent survivre autant que leurs souches sauvages ou même mieux, pendant que d'autres rapports mettent en évidence des effets variables des plasmides sur la viabilité de leurs hôtes (Awong *et al.* 1990 ; Chao et Feng 1990 ; Fernandez-Astorga *et al.* 1992 ; Lebaron *et al.* 1993 ; Muela *et al.* 1994 ; Arturo-Schaan *et al.* 1996b).

La survie des bactéries dans un écosystème aquatique peut être défini comme l'état cellulaire résultant de leur présence dans un environnement hostile où les prédateurs microbiens, l'insuffisance nutritive, les conditions physiques sous optimales et d'occasionnelles toxines et biocides d'origines naturelles ou anthropogéniques coexistent et interagissent entre elles.

Les bactéries vivant dans les environnements naturels doivent constamment s'adapter aux conditions changeantes et aux états alternés de croissance et de non croissance (Morita 1990). Les cellules doivent utiliser des mécanismes sophistiqués pour rester en vie durant un jeûne prolongé. Beaucoup d'études sur le jeûne sont concentrées sur les paramètres génétiques, biochimiques et morphologiques des populations bactériennes (Kjelleberg 1993). Des changements détectables dans les composés cellulaires, tels que les lipides, protéines, ARN et ADN sont décrits (Hood *et al.* 1986 ; Kjelleberg *et al.* 1983 ; Kramer et Singleton 1992 ; Martin 1992) mais peu d'information sur l'hétérogénéité de ces paramètres à l'intérieur d'une population à jeun est disponible.

Les bactéries peuvent répondre de différentes façons aux conditions de jeûne (Clegg *et al.* 1996) par réduction de la taille cellulaire (Lappin-Scott *et al.* 1988), utilisation de composés cellulaires non essentiels (Boylen et Plate 1973), production de protéines de jeûne spécifique

(Nyström *et al.* 1992), réduction du taux de respiration endogène et par la production de cellules viables mais non cultivables (Xu *et al.* 1982).

II.1/ La morphogenèse durant l'état de survie

La phase initiale de réponse à un jeûne est divisée en deux étapes : fragmentation et réduction continue de la taille des cellules fragmentées. Sur la base des travaux publiés (Kjelleberg *et al.* 1983 ; Kjelleberg *et al.* 1982), il est suggéré que les procédés mis en place sont les suivants :

- (1) Le nanisme se produit au-delà de 4 à 5 jours, durant lesquelles une activité métabolique évidente et aucune perte de viabilité sont observées. Ce processus peut être divisé en 2 phases distinctes: fragmentation, donnant une augmentation dans les nombres cellulaires au delà des 2 premières heures, puis réduction continue dans la taille des cellules fragmentées, mais pas d'augmentation en nombre.
- (2) Le jeûne, lequel se produit après la phase de nanisme, est une période de réduction de la taille cellulaire continue, avec peu ou pas d'activité métabolique, et une perte lente de viabilité. A noter que ces cellules naines à jeun possèdent des capacités d'adhésion aux surfaces plus importantes que celles des cellules croissantes (Dawson 1981).

Les cellules de *Vibrio cholerae* observées par microscopie électronique à transmission et par microscopie à épifluorescence après privation de nutriments montrent par exemple de grosses altérations dans la morphologie cellulaire en fonction de leur temps d'exposition (Baker *et al.* 1983).

V. cholera répond à une privation de nutriments par une division cellulaire, une augmentation du nombre cellulaire et puis la formation de cellules coccoïdes ; ceci lui permet d'avoir un plus grand ratio surface/ volume, intéressant pour la captation de nutriments.

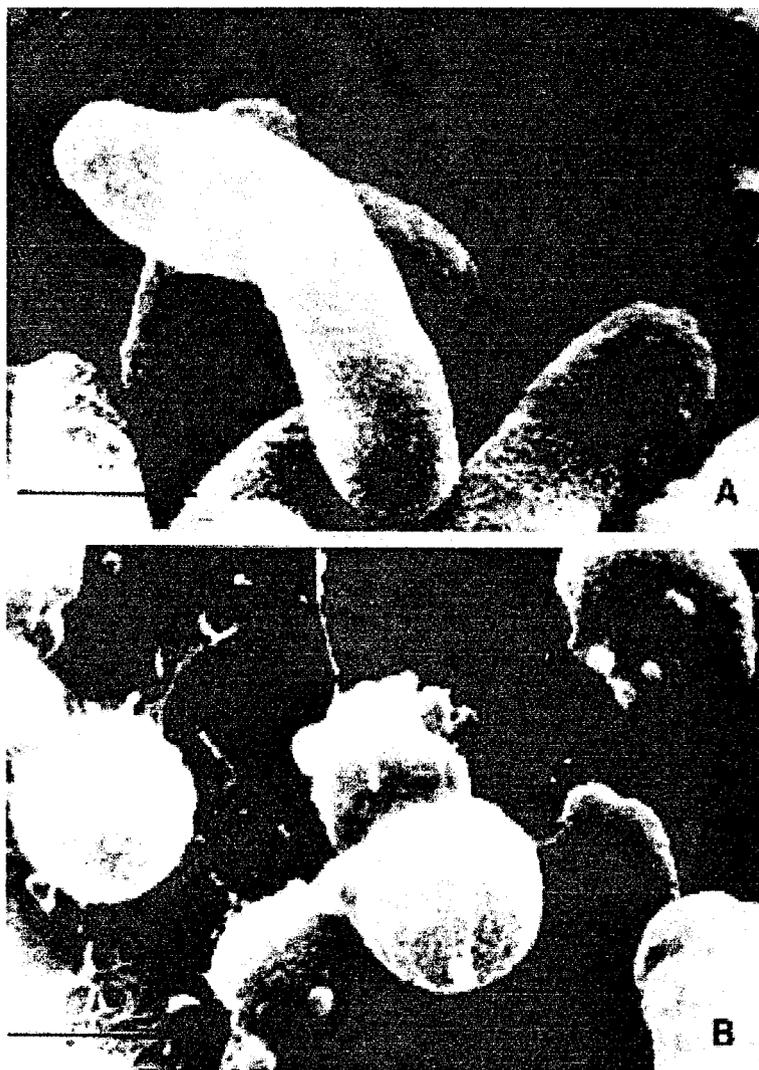


Photo 8 : Microphotographie en microscopie électronique à balayage de *Vibrio parahaemolyticus* 38C1. A, cellules jeunes en phase logarithmique ; B, cellules à jeun depuis une semaine à 3,5°C (Jiang and Chai 1996).

La majorité des cellules bactériennes dans le sol sont extrêmement petites (Bakken et Olsen 1985). La même chose est observée pour les bactéries d'eau de mer (Torella et Morita 1981) et d'eau douce (Fry et Talat 1982). Ces petites cellules sont dites «naines» par Bakken

et Olsen (1996) ils les définissent arbitrairement comme des cellules d'environ $0,07 \mu\text{m}^3$. Ces cellules naines sont des organismes qui s'avèrent incapables de former des colonies sur milieux gélosés en raison de quelques exigences inconnues au sujet des conditions de croissance (Land 1980).

Ainsi, nous rencontrons des changements morphologiques chez *V. parahaemolyticus* (Jiang et Chai 1996), *V. anguillum* (Nelson *et al.* 1997) et *Vibrio sp.* DW1 (Kjelleberg *et al.* 1982), qui passent d'une forme bacillaire à une forme sphérique. D'autres bactéries, *Vibrio sp.* peuvent survivre à de longues périodes de jeûne grâce à des changements séquentiels dans la physiologie cellulaire et des changements graduels dans la morphologie (Dawson *et al.* 1981 ; Hood *et al.* 1986 ; Albertson 1990 ; Kjelleberg 1993).

Des cellules de populations bactérioplanktoniques suffisamment petites pour passer sur des filtres membranaires (Schut *et al.* 1997) sont également désignées sous le terme d'ultramicrobactéries. Retrouvées dans des eaux d'estuaires filtrées à travers une membrane de $0,2 \mu\text{m}$ (MacDonell et Hood 1982), ces ultramicrobactéries sont d'abord définies par Torella et Morita (1981) comme des bactéries de moins de $0,3 \mu\text{m}$ de diamètre. Dans leurs études, ces auteurs définissent ces ultramicrobactéries par 3 critères : diamètre de $0,3 \mu\text{m}$ ou plus petit, incapacité de croissance sur un milieu solide riche en nutriments et pas d'augmentation de taille au moment de la formation d'ultra microcolonies.

Il est suggéré par un grand nombre de chercheurs (Tabor *et al.* 1981 ; Torrella et Morita 1981) que l'adaptation au jeûne implique une série de processus incluant une déplétion de réserves cellulaires et une dégradation de matériel cellulaire non essentiel laquelle est liée aux changements morphologiques dans la cellule tels que la réduction du volume. D'autres études (Novitsky et Morita 1997) démontrent que certaines bactéries marines sont capables de maintenir leur viabilité pendant plus de 70 semaines en condition de jeûne avec le maintien de la concentration cellulaire. Le modèle de dormance proposé dans certains travaux (Tabor *et al.* 1981 ; Torrella et Morita 1981) suggère que les bactéries marines maintiennent leur viabilité pendant les périodes de stress nutritif par maintien d'un état dormant. Les ultramicrobactéries possèdent des caractéristiques similaires aux bactéries dormantes, tout particulièrement lors de réponses aux nutriments. Ces micro-organismes pourraient être donc appariés. La seule alternative serait que les ultramicrobactéries représentent un nouveau type de bactéries. Des indications suffisantes désignent ces isolats non pas comme une nouvelle classe d'organisme, mais comme des bactéries marines de taxon identifiable capables de s'adapter à de faibles niveaux de nutriments.

II.2/ L'adhésion et la colonisation bactérienne lors de l'état de survie

La colonisation des surfaces apparaît jouer également un grand rôle dans la captation des nutriments lors des phases de survie au cours de carences (James *et al.* 1995).

Les changements des caractéristiques de l'attachement bactérien sous différents régimes nutritifs sont liés aux changements d'hydrophobicité de la surface cellulaire (Van Loosdrecht 1987), la sorption est contrôlée nutritionnellement. Il est ainsi déterminé qu'une souche d'*Acinetobacter* cultivée sur des surfaces, répond aux changements d'état nutritif par des changements à la fois de morphologie cellulaire et de caractéristique d'adhésion pour former des microcolonies. Kjelleberg *et al.* (1985) démontrent que les communautés marines bactériennes se multipliant sur un milieu pauvre en nutriments ont une plus grande capacité d'adhésion que les cellules qui cultivent sur un milieu riche. L'adhésion de *P. aeruginosa* est inversement corrélée au taux de croissance (Nelson 1985) et différentes bactéries montrent une plus forte adhésion après le jeûne (Kjelleberg et Hermansson 1984 ; Camper *et al.* 1993).

II.3/ Le métabolisme des cellules dans les périodes de survie

Les variations dans la concentration d'acides nucléiques, la composition protéique, le contenu plasmidique, les profils d'acides gras et ceux de lipo-polysaccharides sont analysés dans ces cellules dormantes en rapport avec l'état normal (Guckert *et al.* 1986 ; Hood *et al.* 1986 ; Kramer et Singleton 1992 ; Nystrom *et al.* 1992).

Lors de jeûne, chez *Pasteurella* (Marouga 1996), *V. vulnificus* (Paludan-Mülle 1996), *Escherichia coli* (Groat *et al.* 1986 ; Matin 1991), *P. putida* (Givskow *et al.* 1994) et *Vibrio sp.* S14 (Nyström *et al.* 1992) une synthèse protéique immédiate est observée.

Les bactéries hétérotrophiques bien adaptées aux variations de conditions environnementales résistent de longues périodes à des limitations de nutriments par la formation d'ultramicrocellules résistantes aux stress et au jeûne (Kjelleberg 1993). Ces cellules privées de carbone et d'autres nutriments possèdent une machinerie de synthèse protéique stable et fonctionnelle et répondent au redressement nutritionnel par une augmentation d'ARN et par la synthèse de protéines (Albertson 1990 ; Flärdh 1994). Ces protéines s'expriment dans un ordre séquentiel, révélant des profils temporels différents qui varient qualitativement et quantitativement selon le micro-organisme étudié.

Les protéines synthétisées transitoirement au début du jeûne peuvent être des protéases ou des peptidases spécifiques (Groat *et al.* 1986). *Bacillus subtilis* produit des protéases durant la fin de la phase logarithmique et les étapes précoces de sporulation (Doi 1972). De plus, une aminopeptidase est trouvée chez *E. coli*, à des niveaux 4 fois supérieurs pendant un jeûne en

phosphate. Ces protéases peuvent posséder une spécificité modifiée comparée à celles utilisées durant la croissance et peuvent être impliquées dans la dégradation des protéines de croissance associées, au début du jeûne.

Srinivasan *et al.* (1998) mettent en évidence la production de métabolites signaux extracellulaires chez *Vibrio* sp. S14 durant une carence carbonée et énergétique. Ces molécules semblent jouer aussi un rôle important dans l'expression des protéines cruciales pour le développement des phénotypes résistants aux stress et aux carences. De petites molécules sont impliquées dans la médiation de l'expression de gènes chez certains micro-organismes. Les butyrolactones sont ainsi reconnues comme des régulateurs de sporulation et de la production d'antibiotiques chez les *Actinomycètes* (Horinuchi 1992). La croissance de *Myxococcus xanthus* exige également un signal extracellulaire qui est un ensemble spécifique d'acides aminés qui fonctionnent individuellement ou en combinaison et qui régissent la densité cellulaire durant un jeûne. Ces composés permettent aux cellules d'estimer qu'une densité cellulaire minimale est atteinte, permettant de ce fait, de poursuivre le développement (Kaplan 1996). Il est suggéré que chez *E. coli*, l'acétyl phosphate, composé intracellulaire à haute énergie, joue un rôle régulateur pendant les stades du jeûne (Nyström 1994). Chez *E. coli*, l'accumulation transitoire du 1,5-anhydroglucitol dans le milieu pendant la phase stationnaire est également observée, et ce composé est défini comme un marqueur métabolique rendant compte des conditions nutritionnelles (Shiga 1993).

Le carbone organique est considéré comme le facteur clé pour la régulation de la croissance microbienne dans l'eau potable (Miettinen *et al.* 1997). Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer la variation des facteurs de conversion du carbone intracellulaire chez les bactéries ; (i) les différences dans la composition taxonomique des communautés bactériennes (Nagata et Watanabe 1990 ; Kroer 1994), (ii) les différences dans les états physiologiques de cellules bactériennes (Nagata 1986), qui peuvent être reliés aux qualités de l'écosystème. La quantité de carbone par cellule (Cc) varie moins que la quantité de carbone par volume (Cv) (Trousselier *et al.* 1997). En effet, une diminution limitée de Cc est observée pendant les premiers jours de jeûne. Ceci peut être la conséquence de la dégradation à court terme de quelques constituants cellulaires, tels que l'A.R.N. (Mason et Egli 1993 ; Cabral 1995) alors que le rapport carbone / volume est directement relié à la quantité d'eau des bactéries, qui dépend des conditions osmotiques dans la cellule (Fagerbakke *et al.* 1996).

Beaucoup de micro-organismes n'ont pas d'énergie suffisante pour poursuivre leur métabolisme de croissance et de reproduction (Morita 1990) car la plupart des matières organiques sont récalcitrantes. Ainsi de nombreuses espèces bactériennes forment des ultramicrocellules et entrent dans un état physiologique connu: celui de la « survie-jeûne ». Cet état physiologique résulte en un arrêt métabolique qui permet aux organismes de survivre durant de longues périodes. La survie-privation est définie comme un état physiologique résultant d'une quantité de nutriments disponibles suffisante pour la croissance et insuffisante pour la reproduction.

Des travaux critiques sur l'effet des conditions de jeûne sont réalisés par Novitsky et Morita en 1978. Ces auteurs démontrent, utilisant un isolat marin ANT300, qu'après 7 jours de jeûne dans l'eau de mer, la respiration endogène est réduite de plus de 90%. Il est discuté que durant la sélection de l'évolution pour la capacité à maintenir la viabilité durant un stress nutritif, la réduction de la respiration peut avoir émergée comme le moyen de contrôle de la dégradation macromoléculaire (MacDonell et Hood 1982). De la même manière, l'inhibition de la respiration cellulaire pendant la transition à l'état viable non cultivable apparaît être un phénomène général (Oliver 1993).

Lebaron et Joux (1994) étudient l'hétérogénéité de la quantité d'ADN dans des cellules de *S. typhimurium* et d'*Alteromonas haloplanktis* à jeûn dans l'eau de mer. Les cellules de *S. typhimurium* contenaient 1 ou 2 génomes et les cellules de *A. haloplanktis* contenaient plus de 6 génomes. Thorsen *et al.* (1992), montrent également la présence de cellules multi-génomiques dans des souches de *Yersinia ruckeri* en jeûne et d'une distribution d'ADN similaire dans *Alteromonas denitrificans*. Ce profil est attribué à l'initiation non synchrone de la réplication dans les cellules en phase logarithmique (Boye 1991).

Généralement, l'ADN apparaît plus stable même durant des périodes prolongées de jeûne (Siegele et Kolter 1992 ; Mukamolova 1995), bien que dans certains cas la quantité d'ADN par cellule décline graduellement au delà d'un certain temps (Hood *et al.* 1986 ; Galdiereo *et al.* 1994).

De récents développements dans les connaissances concernant les réponses physiologiques des bactéries suivant un jeûne nutritif (carbone) sont menés et révèlent un rapide changement dans le profil de l'expression de gènes (Kjelleberg 1993 ; Van Overbeek 1995). Les gènes spécifiques, tels que *rpos*, qui codent pour un facteur sigma S chez *E.coli* (Kjelleberg 1993), sont impliqués dans l'altération morphologique des cellules lors de la transition phase logarithmique-phase stationnaire. Les cellules d'*E. coli* dans un environnement limité en

nutriment ou dans la phase stationnaire montrent un état de résistance intense contre des conditions de stress variées telles qu'une pression osmotique élevée, de hautes températures, un stress oxydatif et un stress d'éthanol (Matin 1991). Par exemple, les cellules d'*E. coli* à jeun sont d'une manière marquante plus résistantes aux chocs thermiques, aux stress osmotiques et oxydatifs. Des résultats similaires sont rapportés pour *S. typhimurium* (Spector *et al.* 1988) et *Vibrio sp* (Nyström *et al.* 1992). La résistance intense au stress due à un jeûne en carbone est également décrite chez *P. putida* KT2442 (Givskov 1994). De façon intéressante, bien que les cellules peuvent souvent être pré adaptées à un certain stress par exposition à doses sub-léthales (Lee 1994), l'état physiologique après un jeûne en carbone protège d'un grand nombre de conditions adverses.

Lors du jeûne, nous observons également des variations de l'activité enzymatique. Ainsi chez *Micrococcus luteus*, les activités d'oxydases et d'enzymes cytoplasmiques sont très rapidement perdues tandis que les déhydrogénases et les cytochromes restent plus stables et que la déhydrogénase isocitrate liée au NADPH a 30% de son activité initiale (Mukamolova *et al.* 1985).

Le jeûne prolongé des cellules de *M. luteus* dans un milieu de croissance entraîne un changement dans la fluidité membranaire. La stabilité relative des protéines membranaires peut être estimée par le fait que le rapport protéines/lipides augmente dans les membranes quand les cellules sont à jeun. Elles peuvent également être affectées par la diminution de la fluidité membranaire. Un effet similaire du jeûne pour produire une augmentation dans la quantité de cardiolipides aux dépens de phosphatidylglycérol dans la phase stationnaire précoce, est noté chez *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Wanner et Egli 1990). Une augmentation des acides gras saturés membranaire est également décrite.

II.4/ La survie-carence dans le modèle *Pseudomonas*

Le jeûne de *Pseudomonas* induit l'altération de la composition chimique des cellules et des surnageants. Les résultats suggèrent que les cellules à jeun utilisent leur polysaccharides, protéines et ARN comme substrats pour le métabolisme endogène. La dégradation de ces molécules entraîne une fuite de ribonucléosides, ribonucléotides et de fragments d'ARN, et la production importante, ainsi que la libération de phosphate inorganique et d'ammonium (Cabral 1994). Le comportement de *Pseudomonas sp.* pendant le jeûne est similaire à celui observé dans plusieurs autres espèces bactériennes (Thomas et Batt 1969 ; Amy *et al.* 1983).

Les molécules réactives à l'orcinol et les matériaux absorbants les UV dont une fraction est probablement des coenzymes (Cabral 1995), sont libérées grandement des cellules pendant les premiers jours de jeûne, alors que la fuite protéique est négligeable. Ces résultats indiquent que la protéine est le substrat du métabolisme endogène des cellules de *Pseudomonas sp.* à jeun. Il apparaît que ces cellules dégradent une partie importante de leur propre réserve et composés structuraux sans perte de viabilité, pourtant certaines dégradations sont la cause de dommages irréversibles .

II.5/ La cultivabilité

La viabilité des bactéries dans l'environnement est un concept de base en écologie microbienne. En réponse à la carence nutritive, les bactéries changent leurs activités métaboliques (Rahman *et al.* 1994) et leurs composants cellulaires (Nystrom *et al.* 1992) pour maintenir leur viabilité durant un jeûne prolongé ; et dans certains cas, elles entrent dans un état non croissant et non multiplicatif. L'état physiologique de non croissance durant la survie est défini comme un état dormant (Kaprelyants *et al.* 1993) ou un état non cultivable mais viable (Roszak et Colwell 1987b).

Ces études suggèrent que les formes non cultivables peuvent avoir des étapes intermédiaires entre la viabilité et la mortalité. Quand les bactéries sont exposées aux stress tels qu'une carence nutritive ou un facteur physico-chimique létal, les cellules exhibent d'abord un état viable mais non cultivable. Ces cellules dans cette phase peuvent restaurer la capacité à se multiplier après un procédé de résurrection. Dans une seconde phase, des parties de constituants cellulaires des organismes non cultivables se dégradent graduellement. Les cellules non cultivables dans cette phase peuvent répondre par un métabolisme actif après administration de nutriments mais ne récupéreront pas l'état cultivable. Dans la troisième phase, seulement des composants cellulaires durables tels que membrane externe, des enzymes et l'ADN peuvent survivre aux effets de facteurs physico-chimiques ambiants (Yamamoto *et al.* 1996).

II.5.1/ La morphogénèse des bactéries viables non cultivables

Cette étude (Kondo 1994) renseigne sur la morphologie de cellules viables non cultivables. L'examen en microscopie électronique porte sur *V. cholerae* et montre quatre structures uniques dans la structure fine de cette bactérie. La taille de la cellule est d'environ 2/3 de la cellule en croissance. La cellule montre une membrane externe ainsi qu'une membrane cytoplasmique et un cytoplasme classique, la membrane externe est ondulée et

possède à sa surface une couche de fines fibres. Leur couche peptidoglycanique est alors épaisse et plus dense aux électrons que celle des cellules normales.

La couche fibreuse trouvée sur les cellules à jeun est similaire à une capsule ou à une couche de longs polysaccharides de la membrane externe de *P. aeruginosa* ou dans celle encapsulée de *Klebsiella pneumoniae* ou d'*E. coli* (Amako 1988 ; Misumi 1994).



Photo 9 : Microphotographies électroniques des polysaccharides colorés de cellules de *Vibrio vulnificus*. (A) Cellules à To dans de l'eau de mer artificielle. (B) Cellules au point de non cultivabilité. Linder and Oliver 1989

Cette couche semble synthétisée *de novo* au cours de la carence, car les cellules en croissance en sont dépourvues.

La surface ondulante de la membrane externe est habituellement rencontrée chez les bactéries à Gram négatif fixées par des techniques classiques. Cependant la fixation révèle que les bactéries en croissance ont une membrane externe plate (Hobot 1984). Par conséquent la surface ondulante des cellules à jeun n'apparaît pas être un artefact. Cette structure est induite par la réduction du volume cellulaire durant le jeûne.

L'augmentation de l'épaisseur du peptidoglycane dans les cellules à jeun est le plus remarquable critère sur le plan morphologique. Le transport de protéines bactériennes ou de nutriments prend place à travers la membrane externe, il se peut donc que l'épaississement des couches externes induit un délai ou un arrêt du transport de matériel à travers la membrane. L'état viable mais non cultivable est rapporté comme étant une sorte d'état de dormance

(Roszak et Colwell 1987b). L'existence d'une telle couche peut donc jouer un rôle important dans le maintien de l'état de dormance durant le jeûne.

II.5.2/ Les caractères affectant cette cultivabilité

L'état viable mais non cultivable (VNC) est affecté par divers facteurs (Troxler *et al.* 1997) tels que la température (Hussong *et al.* 1987 ; Brauns *et al.* 1991 ; Oliver *et al.* 1995 ; Magarinos *et al.* 1997), l'exposition à la lumière solaire (Pommepuy *et al.* 1986), l'exposition à l'hypochlorite (Bej *et al.* 1991), le jeûne (Kondo 1994 ; Rahmann *et al.* 1994 ; Steinart *et al.* 1997)

Il existe autant d'investigations sur les micro-organismes étudiés : *P. fluorescens* (Oliver *et al.* 1995), *P. syringae* (Oliver *et al.* 1995), *E. coli* (Oliver *et al.* 1995 ; Pommepuy *et al.* 1996), *S. typhimurium* (Turpin 1986), *Legionella pneumophila* (McKay 1992 ; Steinert *et al.* 1997), *Alcaligenes eutrophus* (Pedersen 1993) et *Bradyrhizobium japonicum* (Kennedy 1988) que de conditions transitoires (températures, concentration, privation,...).

II.5.3/ Le métabolisme des cellules viables non cultivables

Des études montrent une réduction visible du nombre de ribosomes dans les cellules viables non cultivables, comme on s'y attend pour des cellules dans un état de dormance ou de survie (Hood *et al.* 1986 ; Linder et Oliver 1989). Yamamoto *et al.* (1996) ont révélé dans le même cas une dégradation des sous unités d'ARNr (23S, 16S et 5S).

Nwoguh *et al.* (1995), Davies *et al.* (1995), Rahmann *et al.* (1994) montrent qu'une perte de la cultivabilité n'induit pas nécessairement l'incapacité à synthétiser des protéines et à conserver une activité enzymatique telle que la bêta-D-galactosidase chez les coliformes et d'autres protéines chez *Sh. dysenteriae*.

La microscopie à épifluorescence révèle une très grande hétérogénéité dans la population non cultivable de *V. vulnificus* au regard du contenu en acides nucléiques. En parallèle avec la perte d'acides nucléiques, une augmentation de la concentration de matériel absorbant les UV est observée dans le surnageant de la suspension de cellules non cultivables. L'hypothèse est qu'il y aurait deux phases dans la formation des cellules non cultivables de *V. vulnificus*. La première permet une perte de la cultivabilité avec le maintien de l'intégrité cellulaire, de l'ADN et de l'ARN intacts (et ainsi viabilité possible). La seconde est caractérisée par une dégradation graduelle des acides nucléiques. Un petit nombre de cellules non cultivables,

cependant, gardent ADN et ARN, et ainsi peuvent être viables même avec une cultivabilité réduite (Weichart *et al.* 1997).

Les cellules développent également des résistances améliorées à la chaleur, à l'oxydation chimique et aux stress osmotiques par l'induction de groupes spécifiques de gènes (Groat *et al.* 1986 ; McCann *et al.* 1991). On observe également une augmentation pendant ce jeûne du taux de dégradation des protéines (Reeve *et al.* 1984). Les acides aminés libérés peuvent être utilisés pour la synthèse de protéines spécifiques requises lors de longues périodes de survie au jeûne. Dans *V. cholerae*, comme dans la plupart des *Vibrio sp* étudiés, le jeûne conduit à des changements dans les constituants de la cellule membranaire avec une diminution conséquente des phospholipides (Hood *et al.* 1986).

Les changements durant ou après la transition à l'état VNC incluent donc des changements dans la taille et la forme des bactéries (Roszak et Colwell 1987b ; Linder et Oliver 1989), dans le nombre de ribosomes, dans le contenu des acides gras membranaires à courtes chaînes (Linder et Oliver 1989), et dans le profil de virulence (Hussong *et al.* 1987, Linder et Oliver 1989), comme dans le cas général de survie précédemment décrit dans ce manuscrit.

II.5.4/ La résurrection des cellules VNC

Des espèces bactériennes, incluant *E. coli*, *V. cholerae*, *S. enteritidis*, *Aeromonas salmonicida*, *Sh. sonnei*, *Sh. flexneri* (Colwell *et al.* 1985), *Legionella sp.* (Hussong *et al.* 1987), *Campylobacter jejuni* (Rollins et Colwell 1986) et *H. pylori* (Shahamat 1993) montrent une capacité de transition d'un état viable non cultivable à un état viable cultivable.

De récents travaux sur *Helicobacter pylori* suggèrent qu'une combinaison de facteurs, incluant la température et la concentration en nutriments, joue un rôle soit en combinaison et/ou en relation avec d'autres facteurs environnementaux dans la résurrection de l'état VNC (Mai *et al.* 1990).

Le mécanisme de chocs thermiques sur la résurrection reste à clarifier (Wai *et al.* 1996). Dans certains cas, un pool de protéines est induit pour répondre aux changements environnementaux (Yura 1993). Ce traitement permet ainsi une nouvelle croissance de *V. cholerae*, de *V. vulnificus* (Ravel *et al.* 1995) ou d'autres VNC (Joux *et al.* 1997). L'addition de nutriments génère cette même résurrection chez *S. enteritidis* (Roszak *et al.* 1984), résultat non renouvelé dans l'étude de Chmlelewski et Frank (1995).

La résurrection ou la réversibilité à l'état cultivable n'est pas bien défini et apparaît comme unique pour chaque micro-organisme. De plus, elle est liée à de nombreux facteurs tels que l'espèce, la souche, l'état de dormance, le statut nutritionnel, la salinité du milieu, la température (Rahman *et al.* 1994).

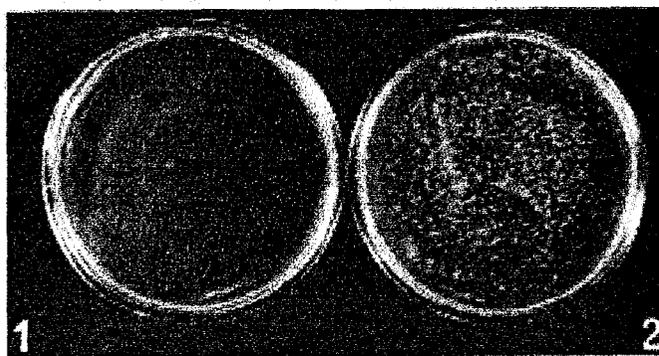


Photo 10 : Colonies de *Vibrio cholerae* apparues après un choc thermique de cellules non cultivables sur M9 salé. (1) sans traitement ; (2) culture sur gélose avec traitement thermique (45°C pendant 1 minute) ; d'après Wai *et al.* 1996.

Tableau 1 : Etudes de la revivification des cellules viables non cultivables d'après Douglad (1997).

Bactérie	Méthode de résurrection
<i>Aeromonas (Vibrio) salmonicida</i>	Addition nutritive
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Passage chez l'animal
<i>Enterobacter aerogenes</i>	
<i>E. Cloacae</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Eschrichia coli</i>	Passage dans l'iléon du lapin
<i>Helicobacter pylori</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Legionella pneumophila</i>	Injection dans des œufs embryonnaires
<i>Micrococcus flavus</i>	
<i>M. luteus</i>	Resuspension dans un milieu frais contenant du lactate et surnageant de cellules en phase stationnaire
<i>Pasteurella piscida</i>	Addition nutritive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>P. fluorescens</i>	Transfert de cellules carencées en azote vers un milieu frais contenant du glucose

<i>P. putida</i>	
<i>P. syringae</i>	
<i>Rhizobium meliloti</i>	
<i>Salmonella enteritidis</i>	Addition nutritive
<i>S. typhimurium</i>	
<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>S. flexneri</i>	
<i>S. sonnei</i>	
<i>Vibrio anguillarum</i>	
<i>V. campbelli</i>	
<i>V. cholerae</i>	Passage dans l'iléon du lapin, choc thermique, intestin humain
<i>V. fisheri</i>	
<i>V. harveyi</i>	
<i>V. minicus</i>	
<i>V. natriegens</i>	
<i>V. parahaemolyticus</i>	
<i>V. proteolyticus</i>	
<i>V. vulnificus</i>	Augmentation thermique, injection dans des souris
<i>Yersinia ruckeri</i>	Addition nutritive

II.5.5/ L'innocuité de bactéries viables non cultivables

Le caractère de virulence des bactéries VNC est d'un grand intérêt dans le domaine de la santé publique. Pourtant, il reste encore de nombreuses incertitudes sur sa nature et son implication épidémiologique. Il existe des faits conflictuels entre une réalité sanitaire apparemment optimiste et des découvertes scientifiques troublantes. En effet, Colwell *et al.* (1990) rapportent que des cellules non cultivables de *V. cholerae*, ingérés par des volontaires, causent des symptômes cliniques de la maladie. Pommepey *et al.* (1996) montrent également un *E. coli* VNC conservant sa pathogénécité, en produisant une entérotoxine. Rahman *et al.* (1996) décrit que les cellules VNC de *Sh. dysenteriae* type 1 non seulement maintiennent leur gène *stx* et leur protéine ShT actifs biologiquement mais également conservent leur capacité d'adhésion aux cellules de Henle 407. Incapables d'envahir ces cellules, elles conservent toutefois plusieurs facteurs de virulence et restent donc potentiellement dangereuses.

Un autre exemple révèle que l'injection de *V. vulnificus* non cultivable, à une dose infectieuse de moins de 0,05 UFC/ml, est létale pour une souris (Oliver 1993). De plus, Lee et Ruby rapportent récemment (1995) que *V. fisheri* VNC présent dans les eaux Hawaïennes, reste capable de coloniser certains organes de jeunes raies (*Eupryma scolopes*).

D'autres expériences avec le modèle animal montrent que *V. cholerae* VNC et *Escherichia coli* entéropathogène sont capables de retrouver leur cultivabilité après passage chez l'animal (Colwell *et al.* 1985). Comme *Legionella pneumophila* ressuscite après croissance sur des embryons de poulet (Hussong *et al.* 1987).

II.5.6/ La cultivabilité dans le modèle *Pseudomonas*

Pseudomonas possède une capacité de rétention de cultivabilité beaucoup plus importante que les autres bactéries à Gram négatif dans l'eau de boisson (Byrd *et al.* 1991). Dans d'autres écosystèmes similaires, *Pseudomonas* sp. est resté cultivable durant 200 jours. Kurath et Morita (1983) trouvent une souche marine de *Pseudomonas* capables de cultiver après 40 jours dans une solution saline. Ces résultats contrastent avec celles de Sjogren et Gibson (1981), qui trouvent que des souches de *Pseudomonas* isolées d'eau de lac montrent un taux de survie de 18% après 24h dans cette même eau et nulle après 24h à 30°C dans de l'eau distillée.

L'existence de cellules viables non cultivables en réponse aux conditions environnementales adverses est observée chez la plupart des bactéries à Gram négatif (Ravel *et al.* 1995) comme *Escherichia coli* (Xu *et al.* 1982 ; Byrd et Colwell 1990), *V. vulnificus* (Linder et Oliver 1989) *S. enteritidis* (Roszak et Colwell 1987b), *Sh. dysenteriae* (Rahman *et al.* 1994), *Sh. sonnei* et *Sh. flexneri* (Colwell *et al.* 1985), *Helicobacter (Campylobacter) jejuni* (Rollins et Colwell 1986) et *Helicobacter pylori* (Shahamat *et al.* 1993).

III/ La nature et la mise en évidence d'une microflore environnementale

III.1/ Les bactéries viables cultivables

Depuis longtemps, les dénombrements bactériens s'effectuent sur milieu gélosé dans les domaines alimentaires et médicaux. Les micro-organismes se développent pour former des colonies (UFC) visibles sur des milieux de culture spécifiques ou non. Les cinétiques de croissance des bactéries sur ces milieux sont fonction de la nature de la source d'énergie, de la présence d'oxygène, du taux de matières organiques, pH, Rh, type de conditionnement, et des méthodes de dénombrement (Température, milieu...). Par conséquent, les données d'aujourd'hui sont encore à interpréter avec prudence comme une sous estimation probable de la flore viable cultivable.

Le dénombrement des cellules bactériennes contenues dans une eau minérale est habituellement réalisé sur des milieux gélosés dont la nature et les conditions d'incubation

influenceront notablement sur le résultat (Schwaller et Schmidt-Lorenz 1980, 1981 ; Witzel *et al.* 1982; Williams *et al.* 1994). Quelle que soit la qualité du milieu utilisé, il existe toujours un écart important entre le nombre de colonies et le nombre de bactéries visibles en microscopie. Le Milieu PCA (Plate Count Agar) est aujourd'hui le milieu recommandé pour le dénombrement standard des bactéries des eaux potables et des eaux résiduaires. Pourtant, le PCA ne permet pas la croissance de certaines bactéries qui peuvent être présentes dans les eaux potables traitées.

La gélose PCA diluée au 1/10 s'avère plus satisfaisante pour les dénombrements de bactéries (Schwaller et Schmidt-Lorenz 1980). De même Williams *et al.* (1994) obtiennent de meilleurs résultats sur des milieux « peptone diluée » que sur les milieux riches comme la gélose au sang ou la gélose trypticase soja. Il n'existe pas de milieux et de conditions d'incubation permettant de retrouver toutes les bactéries viables présentes dans un échantillon d'eau. Reasoner et Geldreich (1985) montrent des différences quantitatives sur la microflore microbienne d'eau selon le type d'ensemencement (étalement, profondeur, membrane filtrante). L'apparence d'une faible diversité bactérienne est peut être un artefact lié à la sélectivité du mode opératoire.

Des milieux de dénombrement, ainsi que des techniques appropriées, sont proposés par plusieurs auteurs (Reasoner et Geldreich 1985; Oger *et al.* 1987; Rivilla et Gonzalez 1988; Schmidt-Lorenz *et al.* 1990).

Un milieu désigné R2A est développé par Reasoner et Geldreich (1985) pour être utilisé dans le dénombrement des bactéries hétérotrophes et pour les cultures des isolats issus d'eau potable.

Les résultats d'études parallèles avec ensemencement par étalement, sur membrane et en masse, montrent que le milieu R2A donne un résultat de dénombrement supérieur au PCA.

Généralement les bactéries aquatiques sont psychrotrophes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer à des températures relativement basses de l'ordre de 4°C et que, pour la plupart, leur température optimale de croissance se situerait aux environs de 28°C; beaucoup d'entre elles sont incapables de se multiplier à +37°C et, qui plus est, à +42°C. Dans les études écologiques des eaux de surface, les températures d'incubation de 10 à 15°C et plus basses encore sont souvent utilisées (Burton *et al.* 1982). Dans ce cas, cependant, les dénombrements ne s'avèrent stables qu'après 4 semaines (Baker et Farr 1997).

Pour le contrôle microbiologique de l'eau, la température de 20°C est généralement privilégiée. Cette température semble satisfaisante pour encadrer les exigences des micro-organismes mésophiles et psychrophiles (Bischofberger *et al.* 1990).

Schwaller et Schmidt-Lorenz (1980), Reasoner et Geldreich (1985) montrent qu'une durée d'incubation trop limitée ne révèle qu'une fraction du nombre de colonies maximal obtenu, après respectivement 14 et 21 jours et dissimule l'apparition de phénotypes spécifiques. Les ensemencements en surface sont plus favorables que ceux effectués en profondeur.

Comme outil de contrôle des populations bactériennes hétérotrophes dans les procédés de traitement des eaux et dans les eaux de distribution traitées, l'étalement ou l'application de membranes sur R2A, incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours est recommandé. Ces conditions fournissent un temps adéquat pour le développement des pigmentations et pour la croissance de bactéries à temps de génération élevé (Reasoner et Geldreich 1985).

Morais et Da Costa (1990) montrent également que l'utilisation de l'eau minérale à analyser plutôt qu'une eau distillée dans la préparation des milieux de culture accroît (1/3) le nombre d'unité formant colonie mis en évidence.

III.2/ Les bactéries viables non cultivables.

Le système d'adduction en eau potable est un écosystème naturel où les bactéries et autres micro-organismes vivent et se reproduisent même si les conditions ne sont pas optimales. Plusieurs facteurs liés aux traitements de l'eau de boisson induiraient des stress bactériens, déclenchant le développement de certains mécanismes de survie (Lechevallier et McFeters 1985 ; McFeters *et al.* 1986 ; Coallier *et al.* 1989). Un de ces mécanismes est une réduction du taux métabolique dans les bactéries qui conduit à un état de dormance (Byrd *et al.* 1991). Près de 98% des bactéries présentes dans l'eau de boisson ne sont pas dénombrées par numération sur gélose (McFeters *et al.* 1986). Les bactéries blessées sont affectées par des composants du milieu et sont incapables de former des colonies sur milieu gélosé (LeChevallier et McFeters 1985). Quand le stress est éliminé, les bactéries peuvent alors réparer leur blessure (McFeters *et al.* 1986). Les fournisseurs en eau font ainsi face à un important problème de sous évaluation de la population bactérienne. Le comptage direct fréquemment utilisé en écologie pour l'évaluation totale des bactéries (Hobbie *et al.* 1977; Porter et Feig 1980 ; Jones *et al.* 1989) est aussi utilisée pour le dénombrement de la population bactérienne des eaux de boisson (Mathieu *et al.* 1992).

L'essor des biotechnologies ces dernières années, a participé au développement des nouveaux outils analytiques de la caractérisation de cellules de différentes natures. D'après Al-Rubeai et Emery (1996), être capable de suivre des caractéristiques telles que la croissance, la mortalité,

la sécrétion, la division cellulaire, le métabolisme et les phénomènes de surface, permet la compréhension et le contrôle des comportements cellulaires.

La microbiologie analytique montre de larges différences entre la microflore mise en évidence sur milieu gélosé et le dénombrement direct en microscopie (Yu *et al.* 1993).

Le développement de la microscopie d'épifluorescence utilisant les membranes filtrantes pour le comptage bactérien dans l'environnement aquatique, conduit à une estimation plus précise du dénombrement total des bactéries (Jones et Simon 1975 ; Zimmermann et Meyer-Reil 1975 ; Hobbie *et al.* 1977 ; Daley 1979). L'utilisation des membranes SYNPOR pour la détermination du nombre de bactéries dans l'eau est bien établi (Simek 1986).

Il y a quelques décennies, sont apparues les membranes filtrantes en esters de cellulose, et l'utilisation de ces membranes s'est largement imposé pour l'analyse microbiologique des eaux.

Plus récemment, sont apparues des membranes constituées non plus d'un feutrage de fibres d'esters de cellulose mais d'un film de polycarbonate, à surface plane percée de trous cylindriques calibrés grâce à un procédé d'irradiation-dissolution. Ces membranes permettent un dénombrement automatisé des bactéries des eaux par examen microscopique direct en épifluorescence (Delattre 1986).

Dans certains aliments, le taux de nutriments, le pH, l'oxygène, l'activité-eau, les conservateurs, etc, varient à différents sites donnant lieu à plusieurs micro-environnements (Dodd et Waites 1992). *In situ* la détection de micro-organismes est développée récemment au bénéfice de l'industrie alimentaire (Fernandez *et al.* 1988 ; Dodd 1990). La microscopie fluorescente est utilisée par Yiu (1985) pour détecter des micro-organismes (bactéries, moisissures) dans les fromages et par Autio et Mattila-Sandholm (1992) pour distinguer l'activité des cellules de levures dans des pâtes.

Une technique de pointe est exploitée à ces mêmes fins: la Cytométrie de Flux (CF). Elle est utilisée comme une méthode rapide pour dénombrer et tester la viabilité des bactéries dans l'eau et dans le sol (Page et Burns 1991 ; Diaper et Edwards 1994 ; Porter *et al.* 1995), étudier les phénomènes de dormance et de carence (Kaprelyants et Kell 1993 ; Diaper et Edwards 1994), tester la sensibilité aux antibiotiques (Martinez *et al.* 1982 ; Steen *et al.* 1982; Cohen et Sahar 1989) et analyser l'effet de la chaleur, de la sonication, et de l'électroporation sur la viabilité bactérienne (Lopez-Amoros *et al.* 1995).

Pour certains auteurs: toute numération indirecte nécessitant culture est, de façon inhérente, sélective donc déficiente. C'est pourquoi, des études sont réalisées sur des fluorochromes utilisés en microscopie à épifluorescence. Ces fluorochromes sont spécifiques des acides nucléiques ce qui rend compte de la flore totale. Ce sont principalement :

- (1) Le 4', 6'- diamidino-2-phenylindole (DAPI). Il est utilisé pour le dénombrement de la flore totale (Bianchi et Giuliano 1996). Il ne se complexe pas avec l'ARN, en revanche il est spécifique des doubles brins d'ADN (Porter 1980). Il signalera ainsi la présence des bactéries considérées comme métaboliquement inactives, dormantes ou temporairement stressées (King et Parker 1988). Les bactéries sont identifiées sur leur couleur mais aussi sur leur taille et leur forme. Il est considéré comme fluorochrome efficace pour le dénombrement de la flore totale (Ju *et al.* 1994). Il donne une fluorescence bleue ou blanc/bleutée après excitation à 365 nm et préfère les séquences riches en A-T (Barcellona *et al.* 1986 ; Barcellona et Gratton 1990 ; Larsen *et al.* 1989 ; Manzini *et al.* 1983) avec un minimum de trois paires consécutives (Kepner et Pratt 1994). Il est généralement utilisé comme second colorant pour rendre compte de la flore totale, après une coloration spécifique (Coallier *et al.* 1994).

Matsuzawa et Yoshikawa (1994) suggèrent que le DAPI interagit avec l'ADN par des groupes phosphates le long de l'ADN. La liaison de DAPI à ces groupes semblent être gouvernée par le pH du milieu. Le DAPI existe comme une forme protonée avec une émission fluorescente maximale proche de 490 nm et comme une forme non protonée avec une émission fluorescente maximale à 440nm (Szabo *et al.* 1986). Pour cela, le maximum de fluorescence de DAPI se situe entre 440 (bleu) et 490 nm (bleu-vert) selon la liaison du DAPI à l'ADN (Barcellona et Gratton 1990; Mazzini *et al.* 1992). La spécificité du DAPI envers les acides nucléiques est remise en question récemment par la découverte d'interférences existant entre le colorant et d'autres constituants, tels que des biopolymères extraits ou synthétiques, et les ARN double brins (Tanious *et al.* 1992), les protéines (Mazzini *et al.* 1992), et les phospholipides (Favilla *et al.* 1993). Une étude récente montre que des bactéries sans nucléoïdes (appelés fantômes) sont colorés par le DAPI et suggère que cette coloration est non spécifique de l'ADN (Zweifel 1995). Ces variations dans le spectre de fluorescence peuvent expliquer la sous estimation du nombre de cellules dans l'eau de mer et dans les sédiments (Suzuki *et al.* 1993 ; Kepner *et al.* 1993, 1994). Une étude récente montre que l'exposition bactérienne aux UV cause une diminution de la fluorescence des bactéries colorées au DAPI (Baleux 1996). Paquin *et al.* (1994) rapportent également que la

fluorescence des bactéries colorées au DAPI dans des suspensions bactériennes pures et dans des eaux potables désinfectées au chlore variaient fortement d'un bleu brillant à une fluorescence amoindrie.

- (2) Un autre colorant, utilisé comme représentatif de la flore totale, est l'Acridine Orange (AO: 3,6 - bis [diméthylamine] acridinium chloride) (Hobbie *et al.* 1977). L'AO se fixe sur l'ADN ou l'ARN et l'excitation maximale est d'environ 470 nm (c'est un intercalant qui se fixe sur les groupements phosphates de part et d'autre de la chaîne). La liaison avec un simple brin donne une fluorescence verte; avec les doubles brins, elle donne une fluorescence rouge/orange *in vivo*. Comme l'ADN conserve sa propriété chez les cellules mortes, toutes les cellules seront comptabilisées (Kepner et Pratt 1994). Toutefois, la réaction colorée à l'acridine orange pourrait prédire une activité physiologique (une bactérie métaboliquement active possède beaucoup d'ARN et une fluorescence verte, une bactérie morte ne possède que son ADN et une fluorescence rouge), mais les conditions de croissance, les variations associées aux procédures de coloration et de fixation, ont également une influence. Par conséquent, il faut être prudent dans l'utilisation de coloration à l'AO pour déterminer la viabilité bactérienne (McFeters *et al.* 1991).

Il y a beaucoup d'autres fluorochromes différents utilisés en microbiologie pour colorer les micro-organismes: l'acridine rouge (Scholefield *et al.* 1976); l'acridine jaune (Afifi et Müller 1975); l'acriflavine (Scholefield *et al.* 1976); l'auramine (Afifi et Müller 1975); l'euchrysine 2GNX (Hobbie *et al.* 1977); le bromure d'éthidium; l'HOECHST (Paul 1982) et le tinopal 4BMT.

Le dénombrement direct au microscope à épifluorescence d'eau filtrée sur membrane puis colorée à l'AO ou au DAPI, montre une flore totale hautement supérieure au dénombrement effectué sur milieu gélosé (Yu *et al.* 1993). En fait, Lopez *et al.* (1994) expliquent ces différences par l'existence d'une microflore viable mais incapable de cultiver sur les milieux de culture testés, d'une seconde population capable de former des colonies et d'une troisième non viable. La présence de bactéries viables non cultivables est confirmée par des contrôles de l'activité d'enzymes spécifiques, du métabolisme cellulaire, de la respiration et de l'intégrité membranaire.

Il existe un autre marquage spécifique des acides nucléiques. En effet, Alfreider *et al.* (1996) confirment la possibilité d'utiliser des sondes marquées par fluorescence et ayant pour cible l'ARN pour la caractérisation de populations bactériennes même dans des habitats oligotrophes. Les techniques de biologie moléculaire, particulièrement les analyses de séquences d'ARNr pour la caractérisation phylogénique de micro-organismes (Woese 1987) permettent l'investigation dans des populations complexes et diverses (Pace *et al.* 1986 ; Giovannoni *et al.* 1990 ; Santo Domingo *et al.* 1998). Ces données taxonomiques ne peuvent être combinées facilement avec les résultats de méthodes bien établies dans l'écologie microbienne telle que la microscopie à épifluorescence (Porter et Fry 1980). L'hybridation de cellules avec des sondes oligonucléotidiques pour ARNr marquées de fluorescence permet la détermination microscopique de la diversité, des morphologies, tailles et survie de différentes bactéries (DeLong *et al.* 1989 ; Amann *et al.* 1990 ; Buswell *et al.* 1998). De telles sondes sont appliquées avec succès dans des applications concernant l'écosystème aquatique comme les eaux douces eutrophes (Hicks *et al.* 1992), les boues activées (Wagner *et al.* 1993) et les bio films (Amann *et al.* 1992; Manz *et al.* 1993). Cependant, aujourd'hui encore, ces techniques sont lourdes et onéreuses.

Ces méthodes montrent toutes un désavantage crucial. En effet, elles sont incapables d'informer sur l'état physiologique des cellules isolées. Récemment, quelques auteurs concentrent leur attention sur l'activité de différents groupes bactériens (Dufour *et al.* 1990 ; Letarte et Pinel-Alloul 1991 ; Garnier *et al.* 1992 ; Letarte *et al.* 1992 ; Bird et Kell 1993 ; Gasol *et al.* 1995) mais seulement l'activité de ces fractions a pu être déterminée. Ceci signifie qu'il faut développer des méthodes qui permettront la détermination de l'activité spécifique telle que la consommation d'oxygène, la réplication de l'ADN, la production de protéines, etc..., des cellules bactériennes individuelles et rapporter cette activité à d'autres paramètres.

III.2.1/ Le contrôle de l'activité respiratoire des bactéries

Parmi les orientations prises dans l'étude des bactéries viables non cultivables, Zimmermann *et al.* (1978) développent une technique d'analyse fondée sur l'activité respiratoire des bactéries.

La coloration redox d'INT (2-(p.iodophenyl)-3-(p.nitrophenyl)-5-phényl tetrazolium chloride) chez les bactéries respirantes est obtenue par des granules insolubles d'INT formazan (Coallier *et al.* 1994). Le transport d'électrons de la chaîne respiratoire, chez les micro-

organismes vivants est responsable de la réduction de l'INT. Les bactéries respirantes accumulent intracellulairement de l'INT formazan qui forme des spots rouge foncé visibles en microscopie photonique. La différenciation entre bactéries respirantes (viables) et non respirantes (mortes) est alors possible (Zimmermann *et al.* 1978; Gribbon et Barer 1995). Toutefois la microflore aquicole est généralement constituée de microbactéries. Cette faible taille rend alors délicate cette recherche par une simple coloration (Yu *et al.* 1995; Webster *et al.* 1985).

La réduction de l'INT est également utilisée pour quantifier le potentiel respiratoire dans les populations microbiennes par extraction organique et détermination colorimétrique de la production de formazan (Blenkinsopp et Lock 1990; Awong *et al.* 1985).

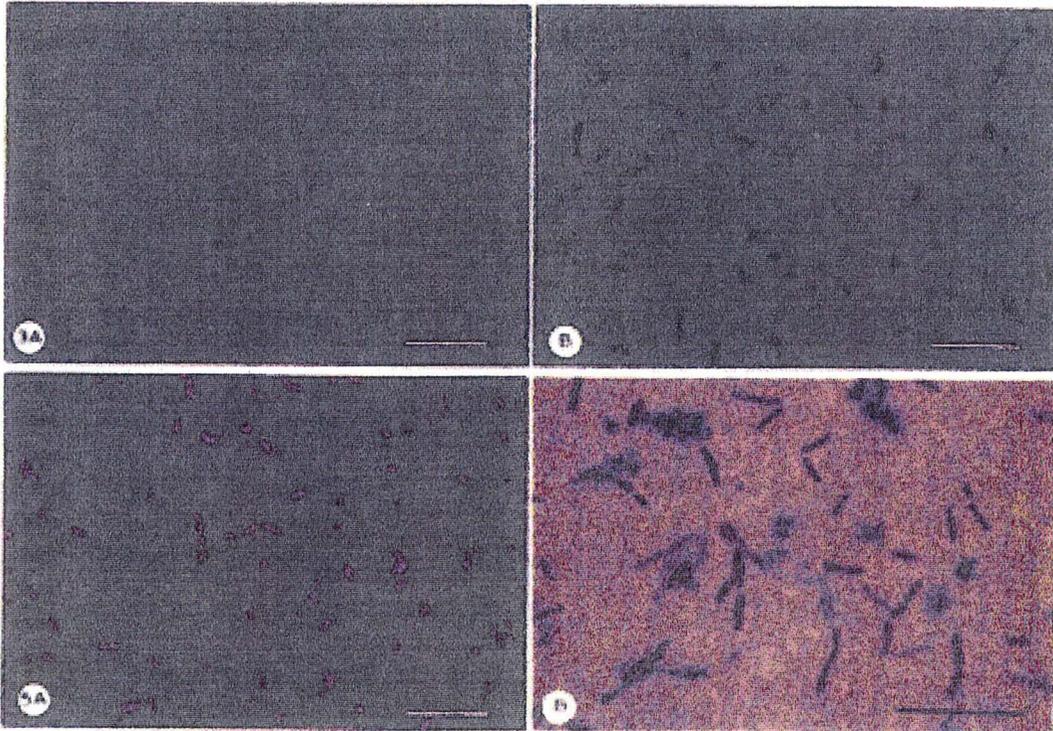


Photo 11: (A) *Pseudomonas putida* tuée par du glutaraldéhyde, colorée par du CTC à 60°C pendant 1 h et observée à l'objectif 100 au microscope à épifluorescence (barre 10µm). (B) Ex296 tuée par du glutaraldéhyde, colorée par du CTC à 60°C pendant 1 h et observée à l'objectif 100 au microscope à épifluorescence (barre 10µm).

Photo 12 : (A) Cellules végétatives d'Ex296 colorées au CTC et observées au microscope à épifluorescence (barre 10µm). (B) Cellules végétatives d'Ex296 colorées par l'INT et observées au microscope photonique à l'objectif 100 (barre 10µm) d'après Walsh *et al.* (1995).

Dans la même optique d'analyse des bactéries respirantes, Coallier *et al.* (1994) entreprennent des travaux à l'aide du chlorure de 5-cyano 2,3-ditolylyl tetrazolium (CTC). Dans le phénomène de respiration, les électrons réduisent le CTC en CTC formazan qui émet une

couleur rouge fluorescente. L'émission de cette couleur est facilement détectable en microscopie à épifluorescence. La réduction du CTC est une méthode efficace pour le dénombrement dans les eaux de consommation. Cette technique est rapide et requiert un faible temps d'incubation (Schaule *et al.* 1993 ; Ullrich *et al.* 1996 ; Pyle *et al.* 1995 ; Bovill *et al.* 1994 ; Winding *et al.* 1994).

A cause de leur fluorescence rouge brillant, les bactéries respirantes sont facilement distinguées des particules abiotiques et autres substances du bruit de fond, qui sont excitées habituellement à des longueurs d'ondes plus courtes. L'utilisation de CTC a grandement facilité la détection microscopique et l'énumération de bactéries actives métaboliquement dans les échantillons environnementaux.

Pyle *et al.* (1995) modifient cette technique en améliorant la filtration précédant l'incubation du CTC. Des cellules retenues sur membrane de polycarbonate sont incubées sur un « pad » absorbant avec du milieu contenant du CTC. La composition du milieu contenant le CTC est très influente sur le résultat du dénombrement (Pyle *et al.* 1995; Smith et Mc Feters 1996).

Les résultats bibliographiques suggèrent que l'intensité du CTC-formazan cellulaire est influencée significativement par le statut nutritionnel des micro-organismes. La pratique commune d'ajouter des nutriments aux échantillons environnementaux durant l'incubation au CTC peut influencer significativement la réponse au CTC. La supplémentation avec de hautes concentrations de nutriments exogènes (R2A et TSB) peut augmenter le nombre de cellules CTC+ mais également masquer des réalités *in situ* (Cook 1997). La quantité du flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire est dictée par la disponibilité et la quantité des substrats oxydables exogènes ou endogènes. Il apparaît que plusieurs organismes augmentent la réduction du tétrazolium, en réponse à des concentrations nutritives croissantes (Quinn 1984; Blenkisopp et Lock 1990 ; Rodriguez *et al.* 1992 ; Schaule *et al.* 1993; Bovill *et al.* 1994).

Des inhibiteurs de composés transporteurs d'électrons, indiquent une réduction du CTC et de l'INT au niveau de l'ubiquinone chez *E. coli* par des déhydrogénases (succinate et NAD(P)H) aérobies primaires. L'INT est également réduit au niveau de l'ubiquinone et des cytochromes B555, B556 (Smith et Mc Feters 1997). La réduction quantitative du CTC est plus étroitement corrélée avec la respiration des cellules que l'INT. Les 2 sels sont réduits à des degrés significatifs sous conditions anaérobies, particulièrement sous la fermentation du glucose.

D'autres agents chimiques stimulent la réduction du CTC et de l'INT. Ces résultats suggèrent des stratégies d'optimisation de méthodes utilisant ces sels pour le contrôle de l'activité respiratoire bactérienne .

Un autre sel de tétrazolium, le 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tétrazolium}-bis(4-méthoxy - 6 nitro) benzen sulfonic acid hydrate (XTT), est utilisé dans l'analyse de l'activité respiratoire des bactéries (Walsh *et al.* 1995). Il est réduit par les électrons engagés dans la respiration ce qui entraîne la formation d'XTT formazan, soluble et orange. Le taux de formazan produit est proportionnel à la biomasse des cellules vivantes. La viabilité des bactéries incubées en l'absence de substrats carbonés exogènes est mesurée par la réduction de l'XTT et comparée avec l'estimation de la viabilité sur boîte de Pétri. Les essais réalisés avec l'XTT sont meilleurs avec une flore bactérienne peu importante (Roslev et King 1993).

D'autres cations de tétrazolium (TCs), le nitrobleu tétrazolium (NBT), le neotétrazolium (NT), le methyl thiazolyldiphenyltétrazolium (MTT) sont examinés par microscopie photonique pour l'application de ces réactifs comme indicateurs cytochimiques de l'activité et de la viabilité microbienne. Les réactions TC constituent un moyen relativement peu sensible dans la détermination de la viabilité. Deux paramètres utilisés dans la sélection de TCs pour la réaction histochimique, lipophilicité et réductibilité, apparaissent déterminant dans la sensibilité de ces réactifs comme indicateur de viabilité cellulaire. Les interactions non spécifiques entre réactifs et colorants, la sensibilité des TCs à l'oxygène, l'effet de la compétition entre l'oxygène et les TCs pour les électrons, influent sur la formation de formazan lors de l'étude de cellules vivantes (Thom *et al.* 1993).

Le TTC (Triphenyl Tétrazolium Chloride) est aussi utilisé comme un accepteur artificiel d'électron pour détecter l'activité déhydrogénase et par conséquent, les bactéries actives métaboliquement (Bitton et Koopman 1982; Kim *et al.* 1987). Ce sel de tétrazolium TTC est, lui aussi, réduit en un formazan rouge insoluble pouvant être extrait à partir de cellules et mesuré colorimétriquement. Il sert à mesurer l'activité cumulée dans les boues activées (Tebbut et Paraskevopoulos 1981; Weddle et Jenkins 1971). Les cristaux de formazan non fluorescents des sels de tétrazolium TTC sont difficiles à détecter microscopiquement et ainsi ont limité leur utilisation, comme pour l'INT.

Finalement, l'INT et ses dérivés sont difficiles à observer car il s'agit de fluorochromes non fluorescents, appliqués sur des bactéries de petite taille. C'est pourquoi certains auteurs préconisent l'utilisation du CTC comme colorant des bactéries respirantes.

III.2.2/ Le contrôle de l'activité enzymatique

L'analyse de l'activité enzymatique constitue une autre approche de l'étude des bactéries viables non cultivables.

Raynel *et al.* (1994) utilisent le diacétate de fluorescéine (FDA) pour colorer les bactéries. Le résultat donne une coloration jaune/verte fluorescente, après excitation à la lumière bleue. Les cellules endommagées ou non viables ne sont pas fluorescentes elles ont perdu leur capacité à hydrolyser le FDA ou à retenir la fluorescéine (Jones et Senft 1985). Le FDA hydrophobe entre dans les cellules vivantes en passant à travers la membrane cellulaire hydrophobe est converti en fluorescéine hydrophile par les estérases. La fluorescéine s'accumule lentement dans la cellule du fait de la faible perméabilité de la membrane (Ramsay et Bawden 1983).

Le FDA est connu pour être hydrolysé chez les bactéries (Lundgen 1981; Chrzanowski *et al.* 1984), dont les moisissures (Soderström 1979), les algues (Gilbert *et al.* 1992) et les rotifères (Moffat et Smell 1995). Il est par conséquent un indicateur potentiel pour toutes les activités estérasiqes. L'activité microbienne est testée par le FDA dans le sol (Schnürer et Rossvall 1982), les boues activées (Fortrieille *et al.* 1992; Jorgenser *et al.* 1995), en mer (Poremba 1995) et dans les sédiments de rivière (Marmonier *et al.* 1995). Cette méthode cependant a le désavantage de ne pas colorer tous les micro-organismes du sol (Lundgren 1981; Chrzanowski *et al.* 1984). Le FDA ne pénètre pas efficacement certains types de membrane et la fluorescéine produite tend à fuir des cellules (Söderström 1979; Thomas *et al.* 1979).

Le 5-6 sulfofluorescéine diacétate (SFDA) est également utilisé pour identifier les bactéries viables sans interférence des matières détritiques et minérales du sol (Takasky *et al.* 1995).

Il est converti en un produit fluorescent par l'activité estérasiqie intracellulaire et colore les micro-organismes vivants, incluant les bactéries, *Saccharomyces cerevisiae* et les moisissures (Tsuji *et al.* 1995). Presque toutes les cellules végétatives et les spores de micro-organismes du sol sont colorés par le SFDA et sa capacité à distinguer les mortes des vivantes, est supérieure au FDA. Il est dissous dans l'éthanol ce qui perméabilise la membrane et permet une meilleure diffusion dans le cytoplasme. L'intensité du SFDA apparaît 3 fois supérieure au FDA.

Un autre dérivé du FDA, le 6 carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) appliqué aux mycélium et aux oospores de moisissures telluriques par Cohen (1984) ainsi qu'à *Listeria*

monocytogenes par Jacobsen *et al.* (1997) produit un composé fluorescent. Il paraît mieux retenu (Thomas *et al.* 1979), bien que son intensité fluorescente ne semble pas assez élevée pour éviter les interférences des particules auto-fluorescentes du sol.

Ce 6-CFDA est utile à l'examen de l'activité enzymatique bactérienne (Schupp et Erlandsen 1987; Yamaguchi *et al.* 1994). C'est un dérivé non polaire et non fluorescent qui pénètre facilement les membranes cellulaires. Il est hydrolysé par les estérases non spécifiques relâchant de la 6-carboxy fluoroscéine ayant une fluorescence vert brillant quand elle est irradiée avec de la lumière bleue (Yamaguchi *et al.* 1994).

Cette technique est appliquée à l'analyse des bactéries dans un environnement naturel (Robertson et Button 1989 ; Trousselier *et al.* 1993) et aussi pour l'étude de cellules eucaryotes.

Abe (1998) a également et récemment utilisé le CFDA ainsi qu'un dérivé, le Carboxydichlorofluorescéine diacétate (CDCFDA) pour mesurer les effets de la pression hydrostatique sur la viabilité des levures.

III.2.3/ Le contrôle de l'activité métabolique

Certains auteurs considèrent l'activité métabolique des bactéries comme indicateur de viabilité. Roszak *et al.* (1987) emploient des substrats radiomarqués, et procèdent ensuite à une analyse micro-autoradiographique. Les métabolites employés sont le [méthyl -³H] thymidine et l'[U³⁴ C-] acide glutamique. Ce sont des métabolites constitutifs des acides nucléiques et des protéines respectivement, qui pourront rendre compte de l'activité métabolique des bactéries. Le [³H] glucose sert également de marqueur d'activité métabolique bactérienne.

Une autoradiographie combinée à la microscopie à épifluorescence est décrite pour déterminer le nombre de bactéries et le spectre des cellules métaboliquement actives sur la même préparation microscopique. Les populations bactériennes incubées avec du glucose (³H) filtrées sur des membranes en polycarbonate et colorées avec de l'AO révèlent une relation entre le nombre de bactéries et le taux de consommation du glucose (Meyer-Reil 1978).

La croissance cellulaire indique également un métabolisme bactérien actif. Kogure *et al.* (1979) utilisent un inhibiteur de la réplication pour empêcher la division cellulaire et observer l'élongation des bactéries. Ces dernières sont considérées comme viables. L'antibiotique

utilisé est l'acide nalidixique de la famille des quinolones (intercalant de l'ADN) et la méthode mise en œuvre est désignée comme « Direct Viable Count » (DVC).

Le plus gros problème que présente la méthode (Kogure *et al.* 1984) est l'inefficacité de l'acide nalidixique sur les bactéries à Gram positif. De plus, certaines souches à Gram négatif sont résistantes à ce composé comme *P. salmonicida*, *Legionella pneumophila* (Morgan *et al.* 1991) ainsi que certaines souches d'*Escherichia coli*. Par conséquent, dans les eaux naturelles, les cellules résistantes conduiront à une sur-estimation des bactéries vivantes.

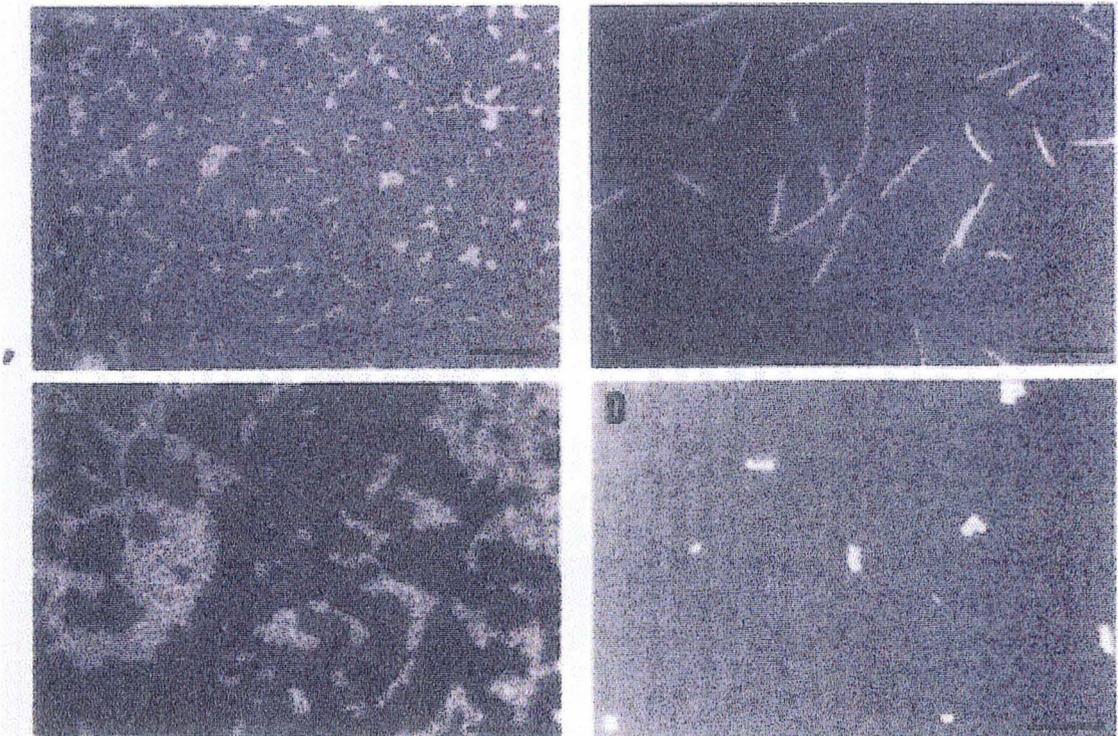


Photo 13 : Images de cultures d'*Escherichia coli* K12 J62 (A et C) et d'*Enterobacter faecalis* (B et D), respectivement avant et après incubation en présence de ciprofloxacine (Barre 5µm) d'après Barcina *et al.* (1995).

La présence de cellules filamenteuses ou pléomorphiques dans certains échantillons d'eau peuvent également compliquer l'interprétation des résultats obtenus avec la méthode de Kogure. De plus, en l'absence de sources de carbone exogènes ajoutées, l'élongation cellulaire peut être très lente ou insuffisante pour une mesure correcte (Lundgren 1981).

Le DVC est repris pour étudier les caractéristiques de bactéries dans des microcosmes (Palmer *et al.* 1984 ; Colwell *et al.* 1985; Heijnen *et al.* 1995) et pour tester la résistance à l'arsenic et au mercure de populations microbiennes (Zeliber *et al.* 1987; Liebert et Barkay 1988). Cette méthode est également appliquée avec succès sur des eaux ou des biofilms ozonés (Adams *et al.* 1991).

D'autres antibiotiques plus ou moins actifs et plus ou moins sélectifs, la pomefloxacin, l'acide pipémidique et l'acide piromidique (Kogure *et al.* 1984) sont utilisés pour la détermination de la viabilité bactérienne.

Barcina *et al.* (1995) différencient par ce moyen les bactéries viables à Gram positif des bactéries viables à Gram négatif. Ils utilisent la ciprofloxacine, une quinolone qui inhibe la division cellulaire des bactéries à Gram positif et négatif, pour quantifier le nombre de cellules viables. L'effet sur la morphologie des bâtonnets et coques est clairement distinct. Le pourcentage de bactéries viables est déterminé dans le cas des bacilles par l'augmentation, soit de la longueur, soit du volume.

Pour éviter la croissance de formes aberrantes et la résistance des bactéries à l'acide nalidixique, l'utilisation d'une combinaison d'inhibiteurs de la division apparaît intéressante. Ainsi, Servis *et al.* (1993) joignent à l'acide nalidixique, de l'isopropyl cinodine qui présente une activité *in vitro* sur les Gram positifs et négatifs (Osburne *et al.* 1989).

Joux et LeBaron (1997) améliorent également la "DVC" par l'utilisation d'un « cocktail » d'antibiotiques à la place de l'acide nalidixique. Ils utilisent cinq antibiotiques inhibiteurs de la réplication, dont quatre quinolones (acide nalidixique, acide piromidique, acide pipémédique et ciprofloxacine) et une bêta-lactame (cephalexine). Il est montré que l'inhibition de la croissance de tous les isolats étudiés ne peut être réalisée avec un seul antibiotique. L'inhibition est plus efficace quand ils sont combinés, rendant possible l'utilisation de cette méthode sur des communautés de l'environnement. En combinaison, la concentration de chaque agent anti-microbien peut être abaissée et le temps d'incubation augmenté.

Ces améliorations permettent de s'adapter davantage à l'expression métabolique de cellules se multipliant lentement et/ou à la revitalisation de cellules à jeun.

La méthode DVC couplée à l'analyse d'image permet le dénombrement de bactéries *in situ* (Lytle *et al.* 1989 ; Yu *et al.* 1993). Cette méthode sert aux investigations *in situ* non destructives, des communautés de biofilms par exemple.

III.2.4/ Le contrôle de l'intégrité membranaire

De récentes recherches démontrent le rapport entre l'intégrité membranaire et la viabilité des bactéries.

Le Live/Dead® est composé de deux fluorochromes : SYTO 9 et l'iodure de propidium. Ces deux colorants se fixent sur les acides nucléiques. Le SYTO 9 donne une coloration verte, alors que le iodure de propidium donne une coloration rouge. Sur la base de l'intégrité membranaire et de l'affinité des colorants pour les acides nucléiques, les bactéries vertes seront dites vivantes, les rouges seront dites mortes (Haugland 1996 ; Jacobsen *et al.* 1997 ; Virta *et al.* 1998).

Tableau 2 : Organismes colorés avec succès par le kit de viabilité Live/Dead® BacLight (Molecular Probe, L-7007, L-7012) (Haugland 1996).

Bactérie	
Gram-positif	Gram négatif
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Propionibacterium sp.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella oranienburg</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Shigella sonnei</i>
	<i>Zymomonas sp.</i>
Mycoplasme	
<i>Eurioplasma eurilytica</i>	
<i>Mycoplasma hominus</i>	
Protozoaire	
Cyste de <i>Giardia muris</i>	

Roth *et al.* (1997) utilisent, dans la même optique, un colorant fluorescent des acides nucléiques qui ne pénètre pas dans les cellules vivantes, pour tester l'intégrité des membranes plasmiques de bactéries. Le SYTOX vert est un colorant asymétrique de cyanure avec 3 charges positives, qui est complètement exclu des cellules procaryotes et eucaryotes vivantes. La liaison du SYTOX aux acides nucléiques rend les bactéries aux membranes lésées vertes

fluorescentes. Cette étude montre que le marquage des bactéries avec le SYTOX vert est une alternative efficace aux méthodes conventionnelles pour mesurer la stabilité bactérienne et la sensibilité aux antibiotiques.

D'autres auteurs utilisent des indicateurs de potentiel membranaire pour identifier les bactéries viables.

La rhodamine 123 (Rh 123) est un colorant lipophile cationique. La coloration varie en fonction du potentiel membranaire (Skowronek *et al.* 1990). Elle est alors utilisée comme indicateur de la viabilité des bactéries (Matsuyama 1984 ; Bercovier *et al.* 1987 ; Davey *et al.* 1993 ; Lopez-Amoros *et al.* 1995 ; Langsrud et Sundheim 1996 ; Jacobsen *et al.* 1997).

Un problème majeur avec la Rh 123 est sa faible accumulation dans certaines espèces à Gram négatif (Matsuyama 1984). Le Tris EDTA est utilisé pour rompre la membrane externe et permettre l'accumulation de la Rh 123 dans de telles souches (Kaprelyants et Kell 1992).

La carbocyanine est également un colorant de la famille des cations lipophiles sensible au potentiel membranaire (Mason *et al.* 1993), mais la fluorescence entre les populations bactériennes viables et non viables n'est pas très discriminante (Mason *et al.* 1995).

Les oxonols tel que le bis 1,3-dibutylbarbituric acid triméthine oxonol, sont des colorants lipophiles anioniques différents de la rhodamine 123 et de la carbocyanine. Ils sont utilisés pour estimer l'effet d'antibiotiques et d'agents antifongiques sur la population microbienne (Carter *et al.* 1993 ; Ordonez et Wehman 1993). La réponse fluorescente varie avec l'amplitude du potentiel membranaire (Mason *et al.* 1993).

Le calcafluor white (CFW) est également utilisé dans la recherche des cellules vivantes. Il est hautement fluorescent sous ultraviolets (Mason *et al.* 1995). Il s'agit d'un sel de sodium 4-4'-bis (4 anilino-bis-diethyl amino-5-triazin-2-ylamino)-2,2'-stilbene acide disulphonique. La mesure de la viabilité des cellules avec le CFW a été corrélée de manière satisfaisante avec l'iodure de propidium et le diacétate de fluorescéine.

La liste ci-dessus des colorants et des techniques de mise en évidence de la viabilité cellulaire n'est pas exhaustive.

Tous ces colorants confirment la présence de bactéries viables non cultivables constituant la flore totale.

Les dénombrements des bactéries viables cultivables (métaboliquement actives, respirantes...) s'avèrent supérieurs à ceux obtenus sur milieux gélosés.

Le choix d'un type de colorant dépend beaucoup de la nature et de l'origine des bactéries ainsi que de l'objectif et des moyens de l'étude.

III.3/ Les acides gras

III.3.1/ Introduction

Les méthodes microbiologiques classiques restent peu satisfaisantes pour l'analyse des communautés bactériennes de l'environnement. En effet, ces méthodes, fondées sur la croissance bactérienne, sélectionnent les bactéries viables et cultivables qui ne représentent que 0,1 à 10% des populations réelles. Ces tests sont longs à mettre en œuvre et ne donnent pratiquement aucun renseignement sur les contraintes de l'environnement (stress, toxicité, statut nutritionnel...) subies par les micro-organismes.

Il est désormais possible d'extraire, d'amplifier et de séquencer tous les acides nucléiques à partir de différentes niches écologiques afin de mesurer la diversité et la phylogénie des composantes de ces communautés. Ces techniques restent néanmoins économiquement prohibitives et parfois difficiles à mettre en œuvre sur certaines communautés en raison d'une co-extraction d'enzymes inhibiteurs de l'amplification en PCR.

Les lipides sont des constituants essentiels de toutes les cellules et des membranes bactériennes (membrane externe et/ou membrane cytoplasmique). Ils sont facilement extractibles à partir de différents environnements (sols, sédiments, eaux de surface ou profondes) et les compositions en lipides et Acides Gras (AG) constituent de véritables signatures biologiques (White *et al.* 1996 ; White et Ringelberg 1997).

De nombreux et divers composés lipidiques peuvent ainsi fournir des détails sur la nature microbienne. Ce sont les stérols (microeucaryotes, nématodes, algues, protozoaires) (Nichols *et al.* 1985 ; Smith *et al.* 1989 ; White *et al.* 1996) des glycolipides (Bactéries à Gram positif phototrophes) ou les AG hydroxylés des LPS du lipide A des bactéries à Gram négatif (LPS-OHFA) (Parker *et al.* 1982 ; Baath *et al.* 1992 ; Ringelberg *et al.* 1994), les sphinganine de sphingolipides (Fredrickson *et al.* 1995), les acétals diméthyls dérivés d'éther de vinyl contenant les plasmogènes (White *et al.* 1996) et dérivés lipidiques polaires d'éther d'alkyl des Archae (Nichols *et al.* 1987).

Les AG sont très largement répandus dans toutes les cellules vivantes. Rarement trouvés sous la forme libre naturellement, ils sont liés à une variété de molécule dont la plus commune est le glycérol. Leurs chaînes s'échelonnent principalement entre 12 et 20 atomes de carbone, au-

delà de ces limites les AG sont inhabituels. Ils sont saturés, linéaires, ramifiés ou contiennent des cycles. Les AG insaturés se rencontrent également et peuvent contenir plusieurs doubles liaisons bien qu'habituellement on n'en décompte qu'une ou deux. La position de cette double liaison est dictée par les voies métaboliques, ainsi les AG insaturés C18 sont différents entre la plupart des bactéries et les micro-organismes eucaryotes.

Saturés ou insaturés, les AG peuvent contenir d'autres groupes fonctionnels que l'acide carboxylique. Ainsi, on rencontre des groupes hydroxyle, oxo, époxy ainsi que des fonctions carboxyles secondaires (Tableau 3).

Les AG ramifiés ont généralement un groupement méthyle branché sur l'avant dernier carbone (iso-) ou l'antépénultième (antéiso-).

Les chaînes d'AG linéaires avec une ou plusieurs doubles liaisons ont été isolées dans la plupart des micro-organismes. La double liaison est habituellement en configuration *cis*.

III.3.2/ Paramètres influençant la composition en acides gras bactériens

Les organismes vivants sont en contact permanent avec leur environnement et ils contrôlent en continu ses caractéristiques et réagissent aux fluctuations en changeant leurs propres fonctions physiologiques. L'évolution conduit à la sélection graduelle et à une fixation génétique des mécanismes efficaces pour l'élimination des facteurs de stress environnementaux. La membrane plasmique est le premier site cellulaire en contact avec son environnement et sa flexibilité et sa capacité adaptative déterminent la capacité de survie des cellules. Les lipides structuraux de cette membrane constituent une partie complexe et insuffisamment connue dans le système d'adaptation.

Tableau 3 : Les acides gras communément rencontrés chez les bactéries d'après Busse *et al.* (1996).

Formule chimique	Nom systématique	Nom commun
Acides saturés		
10:0	Acide décanoïque	Acide caprique
12:0	Acide dodécanoïque	Acide laurique
14:0	Acide tétradécanoïque	Acide myristique
15:0	Acide pentadécanoïque	
16:0	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique
17:0	Acide heptadécanoïque	Acide margarique
18:0	Acide octadécanoïque	Acide stéarique
20:0	Acide eicosanoïque	Acide arachidique

Acides insaturés

15:1	Acide pentadécénoïque	
16:1 <i>cis</i> 9	Acide <i>cis</i> -9-hexadécénoïque	Acide palmitoléique
16:1 <i>trans</i> 9	Acide <i>trans</i> -9-hexadécénoïque	Acide palmitélaïque
17:1	Acide heptadécénoïque	
18:1 <i>cis</i> 9	Acide <i>cis</i> -9-octadécénoïque	Acide oléique
18:1 <i>cis</i> 11	Acide <i>cis</i> -11-octadécénoïque	Acide vaccénique

Acides ramifiées

11:0 iso	Acide 9-méthyl décénoïque	
13:0 iso	Acide 11-méthyl dodécénoïque	
14:0 iso	Acide 12-méthyl tridécénoïque	Acide isomyristique
15:0 iso	Acide 13-méthyl tétradécénoïque	
15:0 antéiso	Acide 12-méthyl tétradécénoïque	
15:1 iso	Acide 13-méthyl tétradécénoïque	
16:0 iso	Acide 14-méthyl pentadécénoïque	Acide isopalmitique
17:0 iso	Acide 15-méthyl hexadécénoïque	Acide isomargarique
17:0 antéiso	Acide 14-méthyl hexadécénoïque	Acide anteisomargarique
17:1 iso	Acide 15-méthyl hexadécénoïque	
10-Me-19:0	Acide 10-méthyl octadécénoïque	Acide tuberculostéarique

Acides cyclopropanoïques

17:0 cyclo 9-10	Acide <i>cis</i> -9,10-méthylène hexadécénoïque	
19:0 cyclo 9-10	Acide <i>cis</i> -9,10-méthylène octadécénoïque	Acide dihydrostérulique
19:0 cyclo 11-12	Acide <i>cis</i> -11,12-méthylène octadécénoïque	Acide lactobacillique

Acides hydroxylés

10 :0-3OH	Acide 3-hydroxy décénoïque	Acide 3-hydroxy caprique
11 :0 iso-3OH	Acide 3-hydroxy-9-méthyl décénoïque	
12 :0-2OH	Acide 2-hydroxy dodécénoïque	Acide 2-hydroxy laurique
12 :1-3OH	Acide 3-hydroxy dodécénoïque	
12 :0-3OH	Acide 3-hydroxy dodécénoïque	Acide 3-hydroxy laurique
13 :0-2OH	Acide 2-hydroxy tridécénoïque	
14 :0-2OH	Acide 2-hydroxy tétradécénoïque	Acide 2-hydroxy myristique
14 :0-3OH	Acide 3-hydroxy tétradécénoïque	Acide 3-hydroxy myristique
15 :0-2OH	Acide 2-hydroxy pentadécénoïque	
16 :0-2OH	Acide 2-hydroxy hexadécénoïque	
16 :0-3OH	Acide 3-hydroxy hexadécénoïque	Acide 2-hydroxy palmitique
18 :1-2OH	Acide 2-hydroxy octadécénoïque	Acide 3-hydroxy palmitique

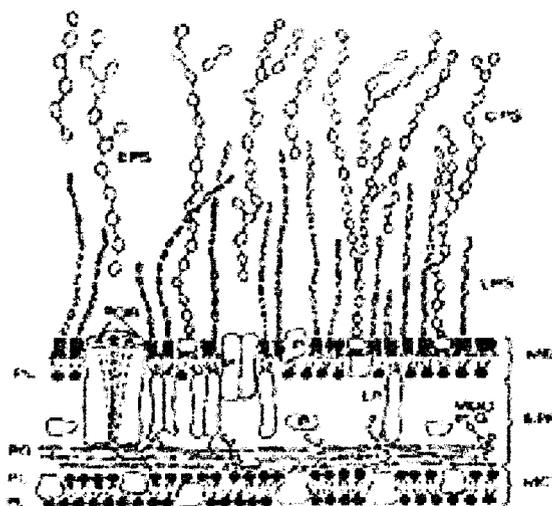


Figure 6 : Représentation schématique des enveloppes des bactéries à Gram négatif en coupe transversale.

La bibliographie concernant l'effet de facteurs environnementaux sur la composition en lipides microbiens est très riche. La température (Golden *et al.* 1994 ; Hazeleger *et al.* 1995), le pH (Schelper *et al.* 1995 ; Drici Cachon *et al.* 1996) et la présence de sel ou d'éthanol (Arneborg *et al.* 1995 ; Yoshikawa *et al.* 1995).

Les stress entraînent une réponse qui inclue des mécanismes universels et des réactions spécifiques chez des micro-organismes particuliers (Weber *et al.* 1994 ; Breierova *et al.* 1996).

Le rapport PLFA/DGFA (acides gras des phospholipides sur acides gras des diglycérides) permet ainsi d'apprécier la biomasse viable cultivable ou non-cultivable et cette méthode est totalement corrélée avec d'autres moyens d'investigation (ATP cellulaire, acide muramique, Acridine Orange Direct Count) (White et Ringelberg 1997 ; Kieft *et al.* 1994). Elle est utilisée avec succès sur les communautés bactériennes des aquifères (Franzmann *et al.* 1996). Le rapport PLFA/PHA rend compte d'un indice de stress généralement d'ordre nutritionnel, il peut atteindre des valeurs de 1/50 pour les bactéries isolées des aquifères (Jain *et al.* 1997). Un ratio A.G. *trans* / A.G. *cis* > à 0.2 indique également un état de stress.

III.3.2.1/ Facteur nutritionnel

Huys *et al.* (1997) et Kämpfer *et al.* (1994) montrent que les différents milieux de culture (TSA et R2A) génèrent des modifications dans le profil des acides gras d'*Aeromonas*. Il apparaît par conséquent important de choisir un milieu de croissance adapté aux exigences des micro-organismes étudiés et d'utiliser des protocoles standardisés à des fins d'études comparatives.

Les carences nutritives induisent des changements dans la composition lipidique. Ainsi dans les cellules à jeun, les acides gras saturés et cycliques augmentent, les acides gras insaturés en configuration *cis* diminuent (Kieft *et al.* 1997 ; White *et al.* 1996 ; Guckert *et al.* 1986).

Les acides gras *cis* sont alors transformés en acides gras *trans* (baisse de la fluidité) ou en leurs isomères cycliques. En effet, l'absence de croissance du micro-organisme ou l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des acides gras n'empêche pas la conversion des acides gras *cis* en leur isomères *trans*. La structure et la taille des acides gras insaturés à configuration *trans* les rapprochent beaucoup plus des acides gras saturés que des acides gras insaturés (Figure 7).

Certains auteurs, considèrent les acides gras *trans* comme des marqueurs de stress nutritionnels (Guckert *et al.* 1986).

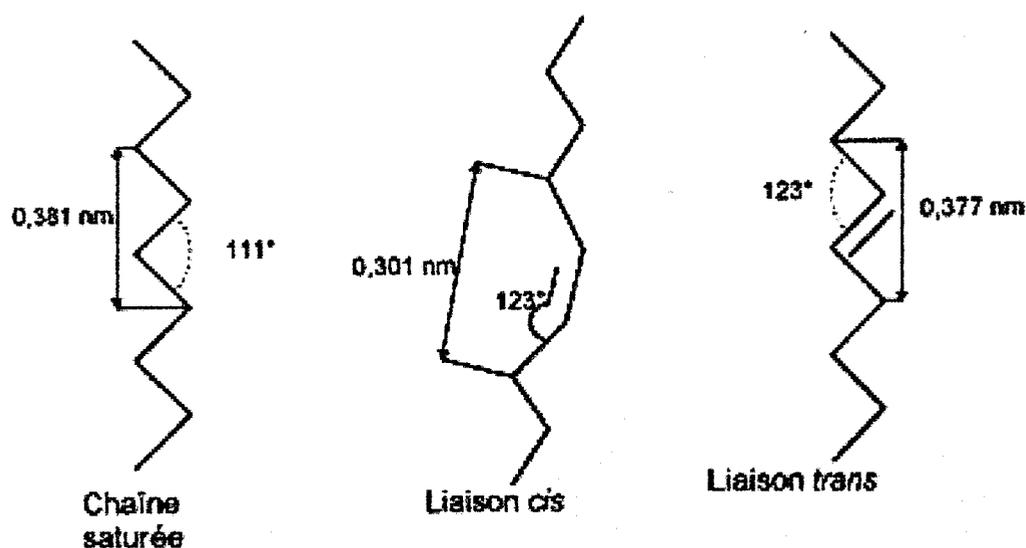


Figure 7: Géométrie des doubles liaisons dans les acides gras.

III.3.2.2/ Paramètres physico-chimiques

Certains facteurs physiques ont une influence sur la composition des acides gras microbiens. Ainsi les acides gras évoluent en fonction des températures ambiantes comme chez les levures (Carratu *et al.* 1996), *Vibrio sp.* (Bakhoo et Herbert 1979 ; Okuyama *et al.* 1991 ; Hendersen *et al.* 1993 ; Hamamoto *et al.* 1994), *Bacillus subtilis* (Suutari et Laasko 1992 ; Grau et De Mendoza 1993), *Sarcina ventriculi* (Berube et Hollingsworth 1995), bactéries de l'Antarctique (Rotert *et al.* 1993), *Bacillus megaterium* (Suutari et Laasko 1992), *Escherichia coli* (Mc Garrity et Armstrong 1981, Sinensky 1971, 1974), *P. fluorescens* (Cullen *et al.* 1971), *Brevibacterium fermentans* (Suutari et Laasko 1992), *Bacillus stearothermophilus* (Martins *et al.* 1990), *Zymobacter palmae* (Okamoto *et al.* 1993), *Listeria* (Püttmann *et al.* 1993), *Proteus mirabilis* (Rottem *et al.* 1978), et *Yersinia enterocolitica* (Abbas et Card 1980 ; Bodnaruk et Golden 1996).

Aux basses températures, les acides gras évoluent vers des composés plus insaturés (Wada *et al.* 1987 ; Adams et Russel 1992 ; Hamamoto *et al.* 1994 ; Heipieper *et al.* 1996) et la longueur de chaîne moyenne diminue (Adams et Russel 1992 ; Püttmann *et al.* 1993 ; Fukunaga *et al.* 1995). A l'inverse, une augmentation de la température tend à diminuer le degré d'insaturation (Abbas et Card 1980 ; Suutari et Laakso 1992 ; Jahnke 1992 ; Hamamoto *et al.* 1994 ; Bodnaruk et Golden 1996). La proportion des acides gras insaturés fluidifiant (qui augmentent le désordre) par rapport aux acides gras saturés non fluidifiant (qui diminuent ce désordre membranaire) au niveau de la membrane joue un rôle majeur dans le fonctionnement membranaire. L'incorporation des acides gras insaturés au niveau des phospholipides diminue la température de transition nécessaire au passage de l'état ordonné à l'état désordonné, alors que l'incorporation des acides gras saturés provoque l'inverse. Un autre facteur qui est la pression, modifie aussi les lipides membranaires (Yano *et al.* 1998).

Certains paramètres chimiques entraînent également des bouleversements dans la composition des acides gras membranaires tels que le pH (Piper 1995 ; Bodnaruk et Golden 1996 ; Brown *et al.* 1997 ; Sajbidor 1997), la pression osmotique (Russell *et al.* 1995 ; Sajbidor 1997), la concentration en sel (Oliver et Colwell 1973 ; Mc Garrity et Armstrong 1981 ; Monteoliva-Sanchez 1986 ; Monteoliva-Sanchez *et al.* 1988 ; Martins *et al.* 1990 ; Adams et Russel 1992 ; Sajbidor 1997) et la présence d'alcool (éthanol, phénol) (Mishra et Kaur 1991 ; Heipieper *et al.* 1992 ; Sajbidor et Grego 1992 ; Okamoto *et al.* 1993)

III.3.2.3/ Phase de croissance

Au cours de la croissance bactérienne, les acides gras subissent des variations quantitatives (Goverde *et al.* 1994 ; Hamamoto *et al.* 1994 ; Abu Hatab et Gaugler 1997). De manière générale, les acides gras mono-insaturés (C16:1w7c, C18:1w9c et C18:1w7c) sont progressivement transformés en acides gras cycliques (C17:0 cyclo 9-10, C19:0 cyclo 9-10 ou C19:0 cyclo 11-12) et les C16:1 diminuent au cours de la croissance. Ce phénomène est d'autant plus accentué que la température d'incubation des cultures est élevée (>20°C) notamment chez les *Pseudomonas* (Cullen *et al.* 1971) et cette conversion est beaucoup plus rapide pendant la fin de phase exponentielle (Figure 8 d'après Cullen *et al.* 1971).

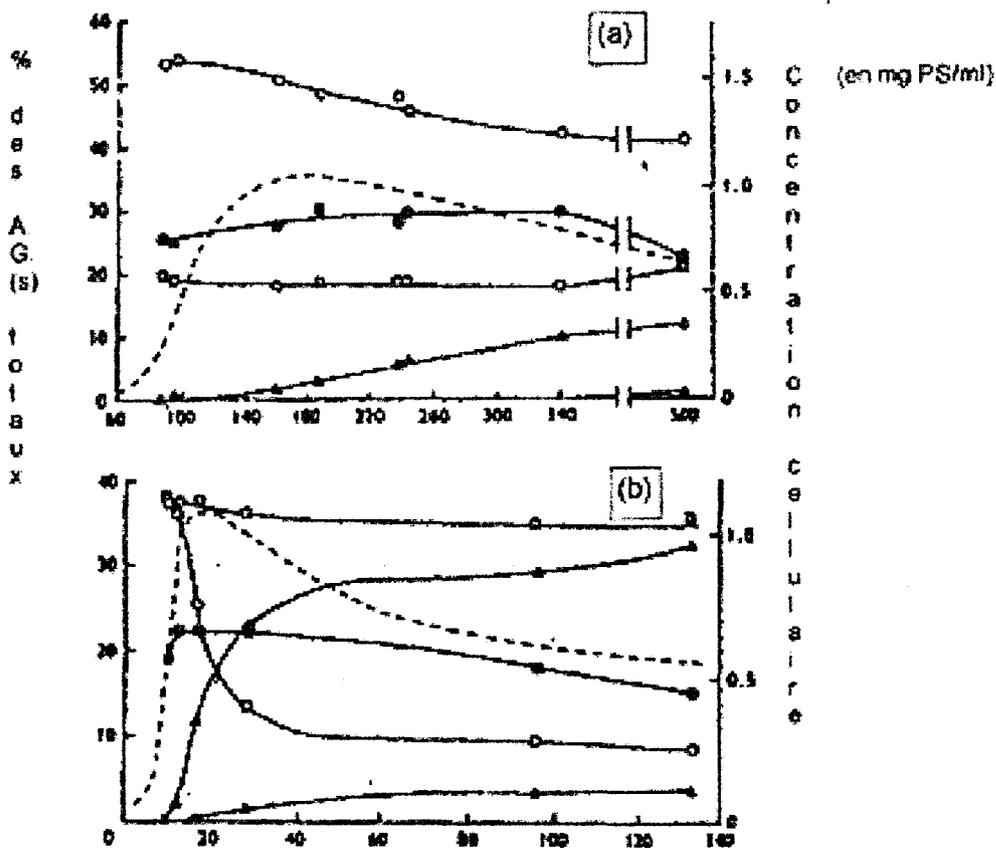


Figure 8 : Evolution des acides gras de la croissance de *P. fluorescens* à 5°C (a) et 30°C (b). □ C16:0 ; ○ C16:1 ; ● C18:1 ; ◇ C17:0 cyclo ; ▲ C19:0 cyclo (Cullen *et al.* 1971).

Bradyrhizobium japonicum, *Bradyrhizobium elkanii* et *Rhizobium meliloti* convertissent le C18 :1 w7C en C19 :0 cyclo 11-12 (Boumahdi 1997). Chez *P. fluorescens*, la conversion se produit plutôt entre le C16 :1 w7c et le C17 :0 cyclo 9-10 (Cullen *et al.* 1971). D'autre part, chez *P. putida*, le degré d'insaturation diminue fortement au cours de cette fin de phase exponentielle alors que le rapport *trans/cis* des acides gras insaturés demeure constant au cours des différentes phases de croissance (Dieffenbach *et al.* 1992). Les bactéries à Gram positif, telles *Lactobacillus fermentum* et *Leuconostoc oenos*, transforment le C18 :1 w9c en C19 :0 cyclo 9-10 et en C19 :0 cyclo 11-12 au cours de la croissance (Suutari et Laakso 1992 ; Drici-Cachon *et al.* 1996).

III.3.2.4/ La régulation de la fluidité membranaire

Les changements environnementaux induisent un système de régulation complexe des cellules qui assure l'ajustement des propriétés physico-chimiques de la matrice lipidique membranaire dans une gamme physiologiquement optimale. Les mécanismes les plus importants sont la désaturation et l'élongation (Cook *et al.* 1988 ; Khaware *et al.* 1995, Cahoon *et al.* 1996), la cyclisation des AG (Suutari et Laakso 1992; Wang et Cronan 1994) et leur isomérisation (Heipieper *et al.* 1992).

La désaturation des AG. Les AG insaturés sont synthétisés dans la plupart des bactéries via une voie anaérobie, incluant une élongation d'AG monoénoïque de courte chaîne à un C16 ou C18 avec un double liaison (Fulco 1983). Morita *et al.* (1992) détectent la désaturation aérobie et anaérobie dans la synthèse d'AG insaturés chez *Vibrio sp.* bactérie marine. La biosynthèse anaérobie des AG insaturés des bactéries, étudiée en détail chez *Escherichia coli* est améliorée par le complexe AG synthétase qui produit principalement du palmitate. Un shunt métabolique existe au niveau de l'intermédiaire C10, une des ramifications pour la synthèse de palmitate et de stéarate, ou encore de palmitoléate et de vaccinate. Une caractéristique importante du point de ramification est le mécanisme de déhydrogénation, l'intermédiaire commun le delta-Béta-hydroxydecanoyl-S-ACP.

La biosynthèse d'AG ramifiés et cycliques. Les bactéries régulent souvent leur fluidité membranaire en changeant la proportion des AG ramifiés iso et antéiso (Kaneda 1991). Les points de fusion d'un acide normal et d'un acide iso avec le même nombre de carbone sont similaires. Cependant leurs plages de transition thermique sont significativement différentes, les acides iso ont une phase entre 18 et 28°C plus bas que celle des saturés (Silvius 1982 ; Lewis et McElhaney 1993). Les AG ramifiés sont synthétisés de deux manières. La première

inclut des chaînes d'acide céto-alpha ramifiées, qui sont associées avec de la valine, de l'isoleucine et de la leucine, alors que la seconde inclut des acides carboxyliques exogènes (Oku et Kaneda 1988 ; Kaneda 1991).

III.3.3/ Classification, taxonomie des micro-organismes

Certains lipides et A.G. sont des marqueurs biologiques caractéristiques de certains groupes de micro-organismes (Welch 1991 ; Sundh *et al.* 1997 ; White et Ringelberg 1997). De nombreux auteurs étudient ainsi la composition lipidique d'une multitude de genres et d'espèces bactériennes. Il s'agit des genres *Pseudomonas* (Dees *et al.* 1983 ; Veys *et al.* 1989 ; Janse 1991 ; Stead 1992 , Rainey *et al.* 1994 ; Vancanneyt *et al.* 1996), *Moraxella*, *Oligella*, groupe CDC (Moss 1988), *Xanthomonas* (Vauterin *et al.* 1992), *Aeromonas* (Huys *et al.* 1994, 1997), Corynéformes phytopathogènes (Henningsson et Gudmestad 1991), *Achromobacter*, *Agrobacterium* (Veys *et al.* 1989), *Vibrio*, *Deleya* (Boe et Gjerde 1980 ; Monteoliva-Sanchez *et al.* 1987), *Desulfovibrio* (White *et al.* 1996), *Desulfobacter* (Edlund *et al.* 1985 ; Dowling *et al.* 1986), les méthylotrophes (Nichols *et al.* 1985), les méthanotrophes (Nichols *et al.* 1985, 1987 ; Pond *et al.* 1998), *Caulobacter*, *Brevundimonas*, *Hyphomonas* (Abraham *et al.* 1997), *Acinetobacter* (Kampfer *et al.* 1992) et *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Chromobacterium*, *Rhizobium*, *Neisseria*, *Kingella*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*.

Les lipides constituent des éléments essentiels dans une cellule. Hormis des polymères de stockage (poly-hydroxybutyrate) et des inclusions d'hydrocarbures, les lipides apparaissent être associés exclusivement avec une des deux membranes. L'ultra structure membranaire des bactéries à Gram négatif est basée sur la superposition d'une membrane externe, d'une membrane interne et d'une couche intermédiaire de peptidoglycane. Dans certains organismes, l'enveloppe possède tous les lipides cellulaires (libres ou conjugués). Les lipides libres représentent typiquement 5 à 10% du poids sec d'une cellule.

La Figure 6 est une représentation schématique de l'organisation moléculaire de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif, au regard des plus grandes lignes. Cette figure souligne l'asymétrie marquée et la composition distincte de la membrane externe. Les critères les plus appréciables sont : (1) l'insertion du lipide A des lipopolysaccharides spécifiquement dans le feuillet externe ; (2) la présence de lipoprotéines, soit libres soit covalamment liées au peptidoglycane ; et (3) la localisation des (phospho)lipides principalement ou exclusivement dans le feuillet interne.

Comparée à la membrane externe, la membrane cytoplasmique est plus conventionnelle. Les données quantitatives sur le contenu lipidique des deux membranes sont limitées, mais par les architectures respectives, elles suggèrent des valeurs plus élevées pour la membrane cytoplasmique (20-40%) que pour la membrane externe (15-25%, grandement dépendant de la taille du poly-saccharide O, par exemple).

Dans la plupart des groupes de bactéries à Gram négatif, les informations sur la composition lipidique concernant les genres et les espèces sont suffisamment détaillées et conséquentes pour définir des profils globaux et reconnaître des critères spécifiques. Par cette approche, les lipides permettraient l'identification et la chimiotaxonomie des bactéries.

Quand nous étudions les lipides de la plupart des bactéries à Gram positif, nous considérons des composés limités à la membrane cytoplasmique et leurs extensions et invaginations comme le mésosome. Quelques espèces montrent des inclusions lipidiques dans le cytoplasme et des associations limitées de glycolipides ou lipides conjugués à la paroi cellulaire. Il apparaît dans un grand nombre d'espèces, que le contenu lipidique du mésosome constitue près de la moitié du contenu de la membrane cytoplasmique.

En dépit de quelques exceptions nous pouvons décrire des règles générales du profil lipidique des Gram positif:

- Ces micro-organismes ne contiennent pas d'AG polyinsaturés.
- Ils ne contiennent pas non plus de larges et complexes structures lipidiques tels que les acides mycoliques et corynemycoliques caractéristiques des mycobactéries et corynébactéries respectivement ainsi que des lipopolysaccharides communs à la plupart voire de toutes les bactéries à Gram négatif.
- Ils n'utilisent pas de stockage intracellulaire des lipides comme ressource d'énergie comme les microeucaryotes (levures, champignons filamenteux).

En ce qui concerne les bactéries susceptibles d'être isolées des eaux minérales, les phosphoglucolipides et sulfoquinovosyl-diacylglycérol (*Caulobacter*, *Hyphomonas* et *Brevundimonas*) ainsi que les sphingolipides (*Sphingobacterium*) représentent des lipides marqueurs très intéressants (Gomes *et al.* 1996 ; Abraham *et al.* 1997) Les A.G hydroxylés présents dans le Lipide A du LPS des *Pseudomonas* et des genres apparentés le sont également (Stead 1992 ; Vancanneyt *et al.* 1996). Les profils d'A.G. permettent d'identifier les bactéries en culture pure (Microbial Identification System, MIDI, Microbial ID, Inc. , Newark, DE, USA). Malgré une base de données regroupant plus de 650 espèces, ce système

se révèle peu performant pour l'identification des bactéries aquicoles (Amy *et al.* 1992 ; Brown et Leff 1996 ; Ferreira *et al.* 1996). D'autre part, de nombreux genres bactériens de l'environnement sont absents de la base de données, certaines bactéries de ces communautés ne se développent pas sur le milieu standard Tryticase Soja Broth Agar et de plus les bactéries viables mais non cultivables échappent à ce type d'analyse.

III.3.4/ Caractérisation de communautés microbiennes

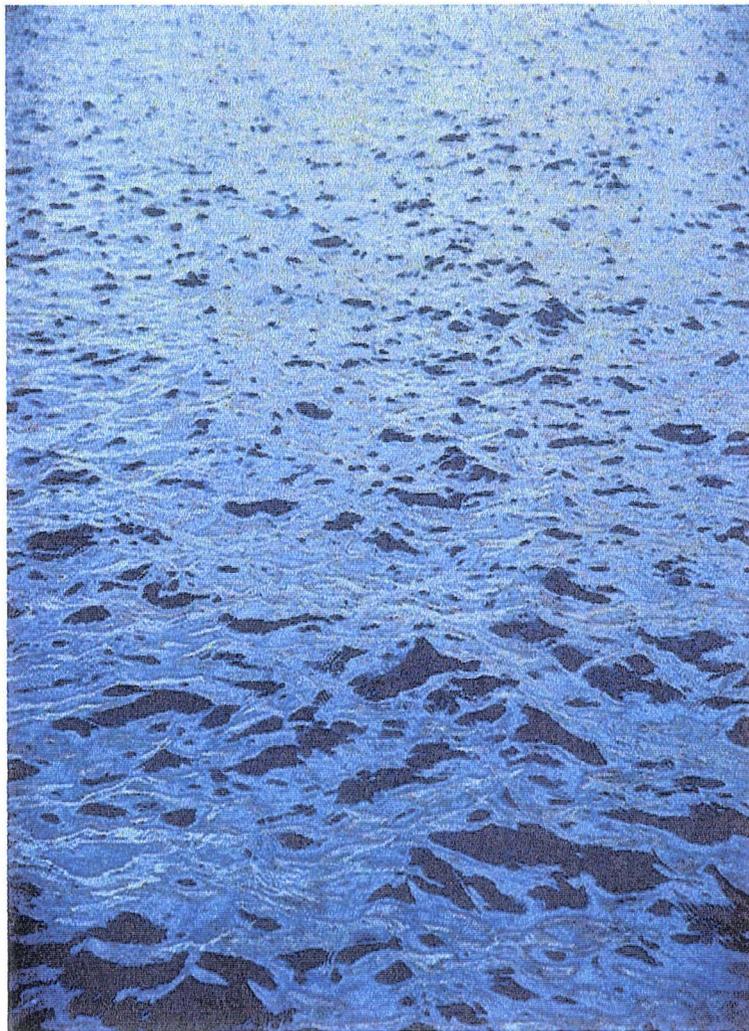
L'analyse d'AG des phospholipides est une méthode établie pour estimer la biomasse microbienne et la structure de la communauté dans un échantillon complexe de l'environnement (Federle 1986; Tunlid et White 1990; Vestal et White 1989 ; Sundh *et al.* 1997). La méthode prend avantage du fait que les micro-organismes diffèrent dans la composition de leur PLFAs. L'intérêt majeur de la méthode réside dans le fait que les AG des phospholipides intacts sont principalement dérivés de la biomasse vivante, le groupe polaire des phospholipides dans la matière organique morte est rapidement hydrolysé (Harvey *et al.* 1986; White *et al.* 1979).

Des groupes majoritaires sont formés par des AG insaturés (typiques des bactéries à Gram négatif), des AG branchés terminaux (bactéries à Gram positif et à Gram négatif anaérobies), des AG branchés méthylés, branchés insaturés (bactéries réduisant les sulfites et/ou actinomycètes) mono insaturé (w8) (bactéries oxydant le méthane) et des AG polyinsaturés (eucaryotes) (Sundh *et al.* 1997).

Les profils d'AG communautaires peuvent être utilisés pour tester les similarités relatives et les différences de communautés microbiennes qui diffèrent d'un point de vue taxonomique. Cependant, des interprétations détaillées des profils d'AG en terme de biomasse ou de composition taxonomique des communautés doivent être regardées avec précaution selon nos connaissances sur la distribution qualitative et quantitative des AG sur une large variété de taxons et en fonction des effets des conditions de croissance sur ces profils (Haack *et al.* 1994).

Les profils d'AG dérivés des composants phospholipidiques de membranes cellulaires des micro-organismes sont donc utilisés pour estimer la biomasse, fournir des renseignements sur la diversité fonctionnelle, taxonomique et sur le statut nutritionnel des micro-organismes associés aux sédiments (Bobbie et White 1980 ; Parkes et Taylor 1983 , Balkwill *et al.* 1988 ; Gillian et Hogg 1984; Guckert *et al.* 1985; Findley *et al.* 1990 ; Mancuso *et al.* 1990; Rajendran *et al.* 1992), aux environnements souterrains (Smith *et al.* 1986), aux sols (Baath *et al.* 1992; Zelles *et al.* 1992), aux bio réacteurs (Nichols *et al.* 1987, 1989), aux racines de

plantes (Tunlid *et al.* 1985, 1989), aux tourbières (Sundh *et al.* 1997) au fumier (Frostergard *et al.* 1997) et aux aquifères (Franzmann *et al.* 1996; Jain *et al.* 1997; Ludvigsen *et al.* 1997). De plus, les profils d'AG sont utilisés pour distinguer les communautés du sol sujettes à différentes pratiques agricoles (Zelles *et al.* 1992), aux pollutions (Baath *et al.* 1992), à l'addition de compost (Tunlid *et al.* 1989) et des communautés de rhizosphères sous différents traitements du sol (Tunlid *et al.* 1985, 1989). Ludvigsen *et al.* (1997) montrent également que les AG des phospholipides reflètent l'effet de pollution sur la composition de biomasse. Les chercheurs optent pour une variété d'approches quant à l'interprétation des profils d'AG. Celles-ci incluent la tabulation des AG connus ou présumés uniques pour un groupe donné ou la comparaison des profils sur la base de ratio de profils de groupes d'AG (Fredrickson *et al.* 1986; Gillian et Hogg 1984; Mancuso *et al.* 1990) ou l'utilisation de statistiques à multivariable pour discriminer entre les profils composés (Guckert *et al.* 1992; Smith *et al.* 1986; Scholz et Boon 1993). Quelle que soit la méthode, l'interprétation des profils d'AG au niveau des communautés est basée sur le fait que les phospholipides correspondent à une proportion relativement constante de biomasse cellulaire et que les variations d'AG entre groupes taxonomiques génèrent une « signature » laquelle peut être détectée et interprétée sans ambiguïté au niveau communautaire (Tunlid *et al.* 1992; Vestal *et al.* 1989).



MATERIELS & METHODES

« Une goutte d'eau assidue, à force de tomber, creuse dans le roc même une crevasse »

Bion de Phlossa (III^{ème} siècle av. J.-C.) – Bucoliques, frag. 1

I/ Les forages

I.1/ La Source du Clos de l'Abbaye

I.1.1/ La géographie

Le forage est situé sur le territoire de la commune de Saint Amand les Eaux (59), dans la parcelle n°136 C - section AE - du plan cadastral. Il se trouve à une dizaine de mètres au nord de la station d'embouteillage sise n°89 de l'avenue du Clos.

Les coordonnées géographiques Lambert sont: X: 678,310 et Y: 306,200. Son altitude absolue au sol est de 16,15 m.

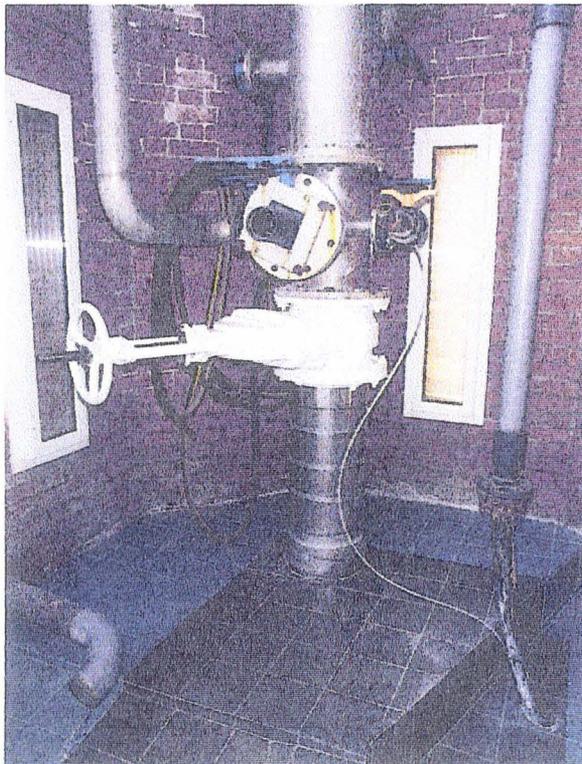


Photo 14 : Le griffon de la Source du Clos de l'Abbaye

I.1.2/ L'hydrogéologie

Le forage traverse de haut en bas des formations sédimentaires successives appartenant (Figure 9):

① au Tertiaire (29 à 33,20 m), représenté principalement par des bancs d'argile et des sables argileux avec à sa base, l'horizon spécifique de ces terrains dit des "argiles de Louvil".

② au Secondaire (33,20 à 71,25 m) étage Crétacé, représenté par des bancs de craie (blanche et grise) du Sédonien, surmontant les marnes bleues (Dièves du Nord) appartenant au Turonien. Un horizon aquifère a été rencontré dans la craie mais n'a pas été finalement capté.

③ à une zone de transition entre le Crétacé et le Primaire (71,25 à 75 m) représentée par des bancs de terrains dénommés "Tourtia" dans le bassin minier du Nord-Pas-de-Calais.

④ au Primaire (à partir de 75 m) représenté par des calcaires et des brèches de l'étage Carbonifère. C'est dans cette dernière formation qu'a été rencontré un nouvel aquifère doué d'un artésianisme important (débit de l'ordre de 1000m³/heure, fin de forage à la profondeur de 89 m) (Cottet 1979).

La présence des niveaux marneux sous-jacents aux assises crayeuses favorise la mise en charge de la nappe des calcaires carbonifères et assure par conséquent l'isolement des deux aquifères. Ceci est particulièrement important du point de vue qualitatif.

1.1.3/ L'exploitation

Le forage a un débit instantané maximum de 150 m³/h. Le débit journalier est de l'ordre de 575 à 600 m³, assurant une production annuelle de 150 millions de litres, soit environ 120 millions de cols. Du point de vue technique et hydrogéologique, rien ne s'oppose à l'accroissement du débit d'exploitation qui permettrait de porter la production annuelle à 200, voire 300 millions de litres.

1.1.4/ La qualité des eaux

C'est une eau très minéralisée, de type anionique mixte sulfatée et bicarbonatée, à la fois calcique et magnésienne. Une analyse de 1991 du laboratoire central de la Lyonnaise des Eaux-Dumez, montre une grande constance des concentrations en ions majeurs, si nous comparons les résultats à ceux des analyses antérieures.



Photo 15 : Etiquette d'une eau embouteillée de la Source du Clos de l'Abbaye

I.1.5/ La datation de l'eau

En première approche, l'analyse de la teneur en tritium dans les eaux de la source du Clos de l'Abbaye a montré l'absence d'apports sub-actuels. La datation de la source par le carbone 14 a permis de donner une estimation du temps de transit des eaux circulant dans l'aquifère au point considéré. Celui-ci semble être de l'ordre de 5000 ans. La grande constante apparente des paramètres chimiques renforce l'hypothèse d'eaux relativement anciennes, à l'abri d'apports d'eaux récents (Chery 1992)

I.2/ La Source Vauban

I.2.1/ La géographie

Le forage a été effectué du 13 janvier au 15 février 1962. Ses coordonnées Lambert sont: X: 681,135 et Y: 305,620. Sa côte à l'émergence est de Z=+20,010m.

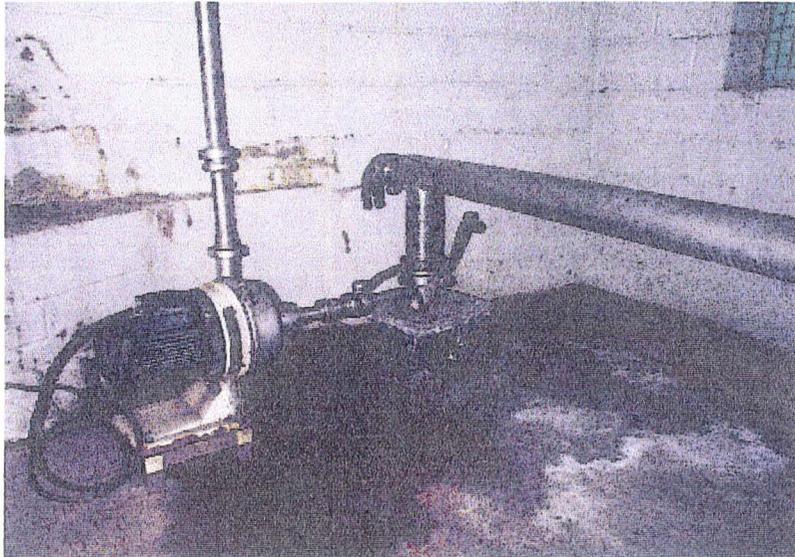


Photo 15 : Le griffon de la Source Vauban

I.2.2/ L'hydrogéologie

D'une profondeur totale de 50 m, ce forage traverse (Figure 9):

- ① 4 m des scories et des limons quaternaires
- ② 15,5 m de sable d'Ostricourt et d'argile de Louvil du Landenien
- ③ 30,5 m de craie du Turonien.

I.2.3/ L'exploitation

Le niveau statique du forage est de 2,5 m. Le débit d'écoulement artésien s'est établi à la fin des travaux à 43 m³/h. Le débit de pompage journalier autorisé: est de 350 m³/j.

Actuellement, la production globale annuelle est de 100 millions de litres en 1998, soit 80 millions de cols.

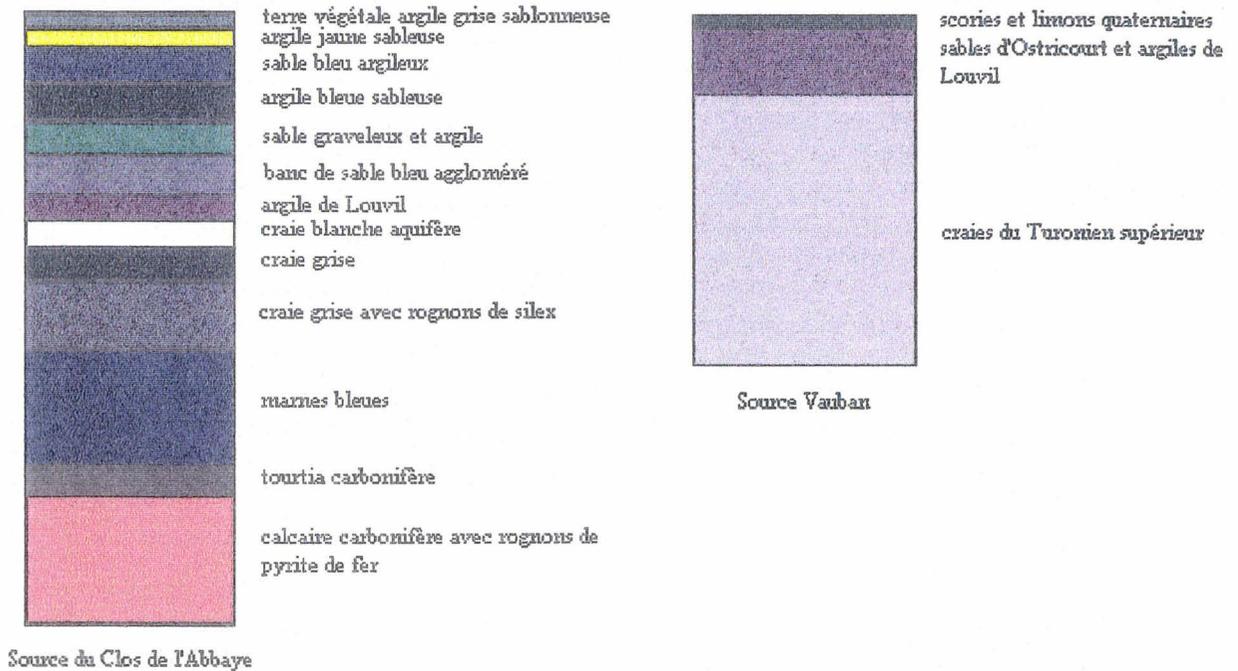


Figure 9 : Coupes géologiques des forages des eaux minérales de Saint Amand

1.2.4/ La qualité des eaux

L'eau de la nappe est fortement minéralisée, sulfatée calcique et magnésienne (Laroche 1987). Elle est dépourvue de nitrate et contient une quantité notable de fluorure.

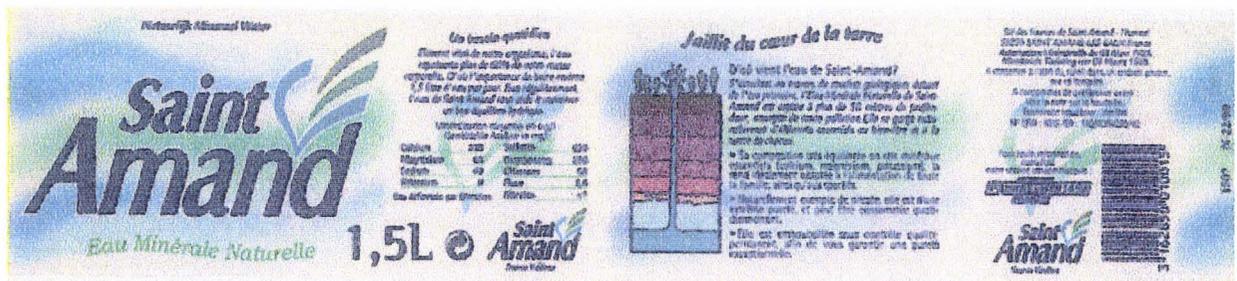


Photo 17 : Etiquette d'une eau embouteillée de la Source Vauban

II/ Les chaînes d'embouteillage

II.1/ La ligne 5

Cette chaîne se trouve à la maison mère, 89 avenue du Clos. Elle embouteille exclusivement de l'eau de la Source du Clos de l'Abbaye (SDCA). Au cours de l'année 1997, la matière plastique des bouteilles a changé; les bouteilles en PVC ont été remplacées par des bouteilles en PET. C'est la chaîne d'embouteillage la plus récente du site. Sa production est orientée exclusivement sur le conditionnement d'eau minérale naturelle plate, de 1,5 l.



Photo 18 : Chaîne d'embouteillage de la ligne 5

II.2/ La ligne 9

Elle se situe dans l'entreprise («Thermale») au voisinage des Thermes de Saint Amand Les Eaux.

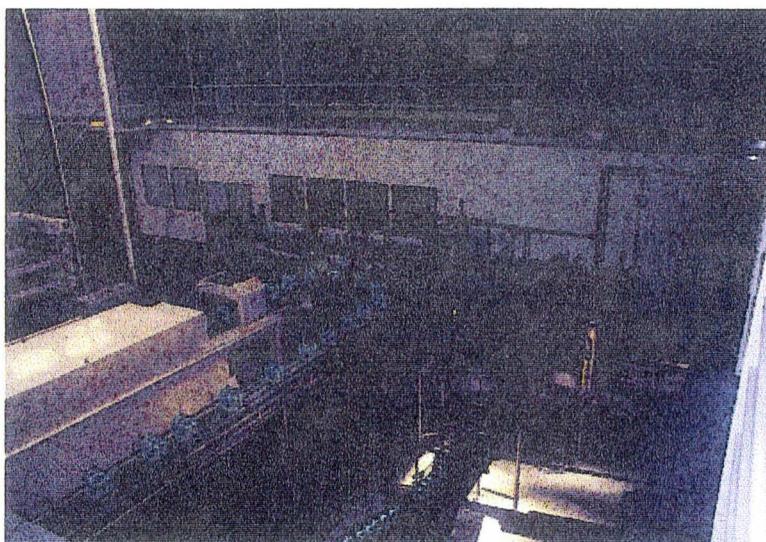


Photo 19 : Chaîne d'embouteillage de la ligne 9

Elle embouteille dans ce cas de l'eau de la source Vauban, mais également celle des sources Amanda et Orée du Bois. Toutes les bouteilles sont ici en PET et leur capacité volumétrique est variable (25 cl ; 1,5 l ; 2 l). C'est la chaîne d'embouteillage la plus moderne. Sa production concerne les eaux minérales naturelles plates et les eaux aromatisées (citron, orange, pomme verte, thé vert-litchee...).

III/ L'étude de la microflore des eaux minérales

III.1/ Les prélèvements

Dans le cas des eaux embouteillées, le prélèvement des bouteilles s'effectue sur le convoyeur après étiquetage et datage, pour une identification précise de l'échantillon.

Dans le cas de l'eau du griffon, plusieurs modalités sont requises selon les besoins volumétriques, les traitements ultérieurs (stérilité,...), la nature du conditionnement (plastique, verre) et la nature de l'eau.

En ce qui concerne les deux sources d'eau minérale étudiées, nous avons utilisé les récipients suivants :

- ① bouteilles plastiques PET (1,5 l) (SDCA, Vauban)
- ② bouteilles plastiques PVC (1,5 l) (SDCA, Vauban)
- ③ bouteilles en verre (1 l) (SDCA, Vauban)
- ④ flacons plastiques, stériles, de 500 ml (Vauban) (réf. GROSSERON, OO260155)
- ⑤ containers en Nalgène (15 l)

La stérilisation des bouteilles plastiques est obtenue lors des procédés de fabrication, celle des récipients ③ et ⑤ est effectuée par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

III.2/ La filtration

Pour l'étude microbiologique des eaux, il s'avère souvent utile de concentrer l'échantillon pour observer et/ou obtenir des résultats significatifs. Nous sommes par conséquent amenés à filtrer certains échantillons. Dans le cas du dénombrement de cellules viables cultivables, nous utilisons pour les eaux du griffon des « mouchards » (réf. Sartorius, SM16254) et pour les eaux conditionnées en bouteille une rampe à filtration Millipore (réf. XX2604735) reliée à une pompe à eau (photo 20).

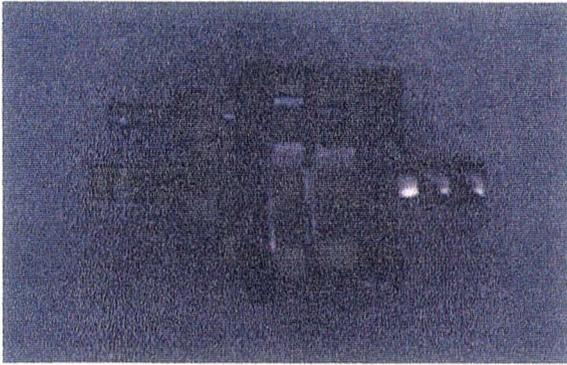


Photo 20 : Système de filtration appelé mouchard

Les « mouchards » stérilisés par autoclavage sont munis de flexibles et de serflex pour permettre les raccords étanches aux robinets de prélèvement.

Quelque soit la technique de microfiltration, les membranes stériles sont en acétate de cellulose, de porosité $0,2 \mu\text{m}$ (réf. Millipore GSWP 04750).

Dans le cas d'une étude microbiologique directe (sans culture), le système de microfiltration est différent. Il est constitué d'un porte filtre (réf. Millipore XX1002505) et d'une colonne (réf. Millipore XX1002514) fixés sur une fiole de garde reliée à une pompe à eau. Les membranes filtrantes utilisées sont noires, en poly carbonate, d'une porosité de $0,2 \mu\text{m}$ (réf. Millipore GTB O2500). Lorsque des microquantités sont à filtrer, de l'eau distillée stérile est ajoutée dans la colonne pour permettre une meilleure dispersion de l'échantillon sur la surface filtrante.

III.3/ La mise en évidence de différents types (viables, cultivables...) physiologiques des bactéries

III.3.1/ La microscopie à épifluorescence couplée à l'analyse d'image

Cette technique s'applique tout particulièrement aux eaux minérales dans lesquelles les formes cellulaires cultivables sont en proportion infime.

III.3.1.1/ Le principe

La microscopie à fluorescence permet d'observer des objets fluorescents naturels ou rendus fluorescents dans leur préparation. La fluorescence moléculaire est l'émission de lumière due au passage d'une forme excitée d'électron à une forme native. Elle

s'accompagne d'une perte d'énergie sous forme de lumière fluorescente. Une molécule ne peut être excitée que par des radiations qu'elle peut absorber.

Les accessoires sont :

① Une source lumineuse pour exciter. La plus utilisée est la lampe à vapeur de mercure. Les raies d'émission du mercure sont suffisamment nombreuses et énergétiques pour que l'une d'entre elles se situe dans le spectre d'excitation des molécules à exciter dans la préparation.

② Le filtre d'excitation. C'est un filtre passe bande. Il permet de ne laisser passer qu'un intervalle spectral étroit centré autour de la longueur d'onde d'excitation spécifique des molécules à exciter. Il s'agit d'un filtre interférentiel dont l'avantage est d'associer une bande passante étroite avec une bonne luminosité.

③ Le filtre anticalorique. Associé souvent au filtre d'excitation au cas où ce dernier laisserait passer les infrarouges. Son rôle est de couper les extrémités du spectre d'émission de la source dans les ultraviolets et les infrarouges, limitant ainsi l'échauffement du filtre d'excitation de la préparation.

④ Le filtre d'arrêt. Placé le plus souvent dans le tube, c'est généralement un filtre passe haut qui ne laisse passer la lumière qu'au-dessus d'une certaine longueur d'onde. Il permet de bloquer la diffusion de la lumière d'excitation par la préparation, pour n'obtenir qu'une seule image à partir de la seule lumière émise par la fluorescence.

III.3.1.2/ L'utilisation du microscope à épifluorescence.

Il est recommandé de monter le système d'illumination muni de filtres d'excitation et d'émission adaptés aux fluorochromes utilisés. Les observations sont plus nettes dans une salle en semi-obscurité. Les préparations sont observées à l'objectif 100x sous huile à immersion (réf. Nikon $nd=1,515$). Le microscope utilisé est un Nikon Optiphot-2/X 2F-EF D3 à épifluorescence.

- Le kit de filtre (réf. Nikon, B2A) utilisé pour l'Acridine Orange (AO) ainsi que pour la coloration au Live-Dead (L/D) est le suivant :

- ① un filtre d'excitation pour les longueurs d'ondes allant de 450 à 490 nm;
- ② un miroir dichroïque 505;
- ③ un filtre d'arrêt pour les longueurs d'ondes inférieures à 520 nm.

- Le kit de filtre utilisé pour la coloration au chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium (CTC) est le suivant :

- ① un filtre d'excitation pour les longueurs d'ondes allant de 420 à 450 nm;

- ② un miroir dichroïque 505;
- ③ un filtre d'arrêt pour les longueurs d'ondes inférieures à 590 nm.

Le microscope peut être muni d'un appareil photographique (Nikon FDX-35) pour sauvegarder sur papier nos observations. Il possède également un système d'analyse d'image qui effectuera des enregistrements microcinématographiques et un grand nombre de calculs. Les paramètres retenus dans nos études sont le dénombrement ainsi que la mesure des surfaces et des projections orthonormées des cellules fluorescentes. Le système est constitué d'une caméra noir et blanc (Nikon, TV Lens C-O.45X, high performance CDD camera COHU, S/N 266425), d'un ordinateur multimédia (Panasonic) et d'un logiciel de traitement (Clara Vision, Perfect-Image V.4.01).

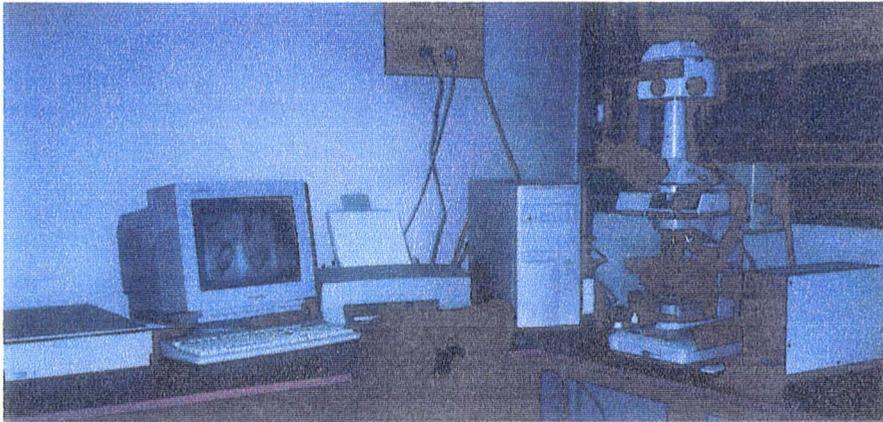


Photo 21 : Microscope à épifluorescence Optiphot 2, Nikon.

III.3.1.3/ Dénombrement des cellules sur membrane (Terzieva 1996)

Un minimum de 10 champs est compté au microscope. La concentration bactérienne totale (N) par millilitre d'échantillon est calculée ainsi:

$$N = (M \times CF \times DF) / V$$

Où M est le comptage des champs microscopiques, représentant le nombre moyen de bactéries par champ, V est le volume filtré, CF est le facteur de conversion membranaire, et DF est le facteur de dilution. CF est le ratio entre la surface filtrante de la membrane $((1,5 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2 / 2)^2 \times \pi \cong 1,8 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2)$ et la surface du champ microscopique $((112,05 \mu\text{m} \times (1) 74,70 \mu\text{m} = 8370 \mu\text{m}^2)$, soit 21113.

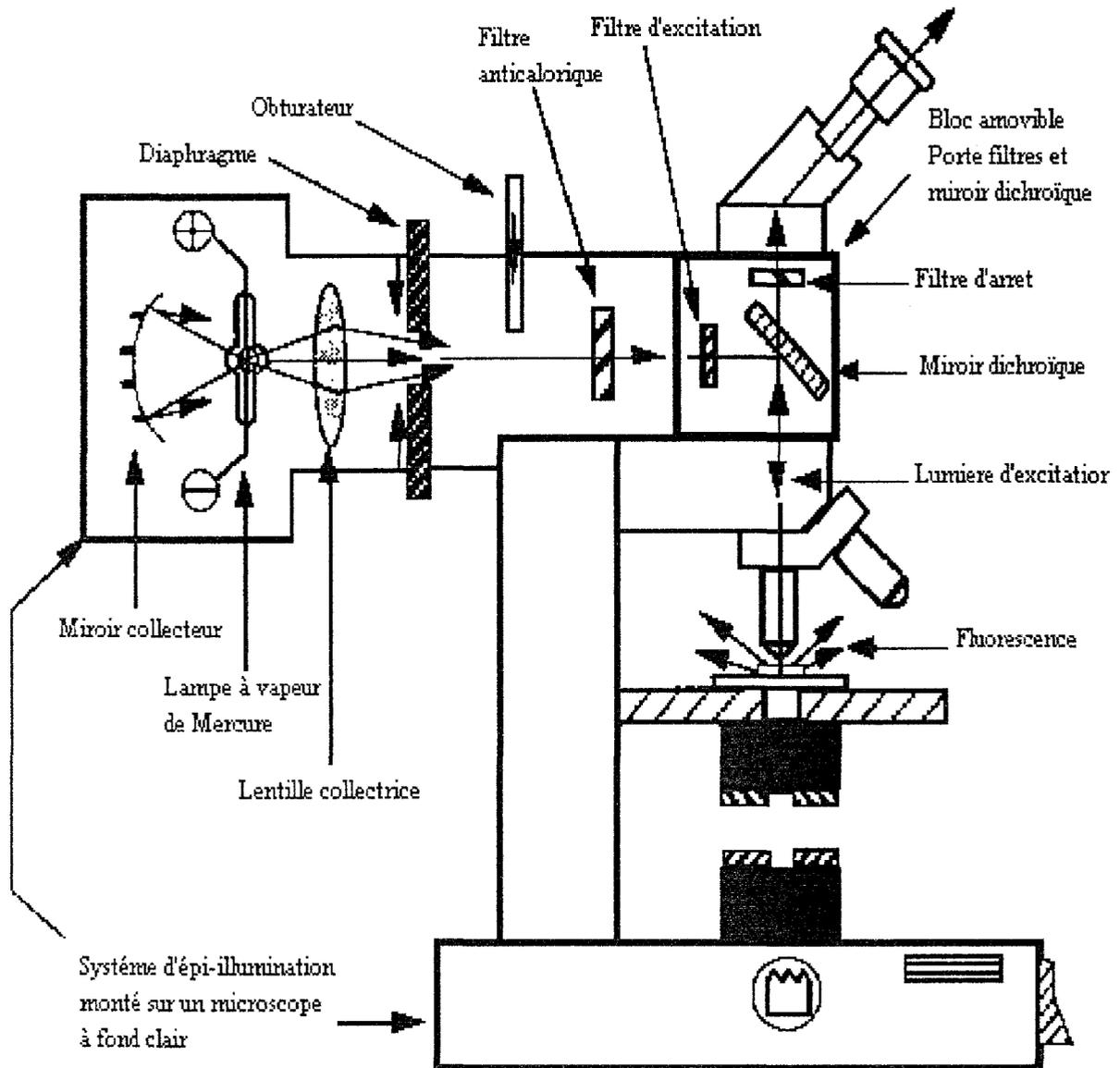


Figure 10 : Schéma représentatif du microscope à épifluorescence

III.3.2/ Les cellules totales

L'Acridine Orange (AO) permet de compter la totalité des micro-organismes (morts et vivants) car elle colore les acides nucléiques (ADN et ARN) des bactéries. Si les échantillons ne peuvent être lus aussitôt après leurs préparations, ils peuvent être stockés avant coloration en ajoutant à l'échantillon 2% de formaldéhyde (40% v/v en solution aqueuse) et en les conservant au réfrigérateur à 4°C.

La technique de coloration est simple à réaliser. Après filtration d'un volume défini de l'échantillon ou d'une dilution, 1 ml d'une solution d'AO (Fluka, 01662) (0,01% w/v dans un tampon acétate pH 4) est ajouté sur la membrane. Le colorant doit rester en contact 3 à 5 minutes avec les cellules retenues, avant d'être filtré. Une fois le colorant éliminé, la

membrane est placée sur une lame de verre pour être observée au microscope à épifluorescence. La totalité des bactéries qui ont une fluorescence verte et rouge/orange peut alors être dénombrée.

Le kit Live/Dead (L/D) BacLight (Molecular probe, réf. L-7007) permet de compter sélectivement les microorganismes vivants et morts. Il est constitué de 2 colorants, et le principe est basé sur l'affinité des colorants pour les acides nucléiques et sur l'intégrité membranaire. Les cellules vivantes apparaissent en vert fluorescent et les mortes en rouge fluorescent.

Un ml d'échantillon est additionné à 3µl de L/D dans un tube Eppendorf. Le mélange est passé au vortex puis laissé à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. La préparation est ensuite filtrée selon les modalités usuelles puis observée au microscope à épifluorescence.

Si la densité bactérienne est assez faible dans les échantillons, 10 à 15 ml sont prélevés stérilement et placés dans la colonne, puis filtrés directement. Nous gardons 1 ml de l'échantillon auquel nous ajoutons 3 µl de L/D pour colorer les bactéries fixées sur la membrane. L'entonnoir (et son contenu) est maintenu à l'obscurité pendant 15 minutes. Une nouvelle filtration est réalisée après le temps d'incubation et la membrane est observée comme précédemment.

III.3.3/ Les cellules viables cultivables (VC)

III.3.3.1/ Le choix des milieux de culture

Une étude comparative est menée sur plusieurs milieux de culture. Les deux eaux minérales plates embouteillées, Vauban et Source du Clos de l'Abbaye, sont examinées. Elles sont entreposées à 20°C à l'obscurité. Les eaux ont été analysées 1 semaine, 1 mois et 3 mois après leur embouteillage. Trois bouteilles étaient étudiées par source pour la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} analyses. Nous avons pratiqué par bouteille, deux séries de dilutions décimales dans de l'eau distillée stérile et ensemencé deux boîtes en parallèles par gamme de dilution. L'ensemencement était pratiqué en surface par étalement de 0,1 ml sur trois milieux différents R2A (réf. Difco, 1826-17-1), PCA (réf. Biokar, BK043) et PCA/10 (Tableau 4).

Les boîtes de Pétri sont incubées à 20°C dans une étuve thermostatée pendant 21 jours. Nous avons effectué ensuite, le comptage répété des colonies après 1,5 , 3, 7, 14 et 21 jours.

Tableau 4. Composition des milieux de culture R2A, PCA, PCA/10, PCA/10 MM, PCA/10 MO et PCA/10 MOM.

Ingrédient	Concentration (g/l)					
	R2A ^a	PCA ^b	PCA/10 ^c	PCA/10 MM ^d	PCA/10 MO ^e	PCA/10 MOM ^f
Extrait de levure	0,5	2,5	0,25	0,25	0,25	0,25
Glucose	0,5	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1
Acides aminés caséiques	0,5	-	-	-	0,5	0,5
Peptone N°3 Difco	0,5	-	-	-	0,5	0,5
Amidon soluble	0,5	-	-	-	0,5	0,5
Pyruvate de sodium	0,3	-	-	-	0,3	0,3
K ₂ HPO ₄	0,3	-	-	0,3	-	0,3
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05	-	-	0,05	-	0,05
Peptone de caséine	-	5,0	0,5	0,5	0,5	0,5
Agar	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0

^a R2A : Reasoner et Geldreich (1985)

^b PCA : Plate Count Agar

^c PCA/10 : Plate Count Agar dilué 10 fois

^d PCA/10 + MM : PCA/10 avec la matière minérale du milieu R2A

^e PCA/10 + MO : PCA/10 avec la matière organique du milieu R2A

^f PCA/10 + MOM : PCA/10 avec la matière minérale et organique du milieu R2A

Lors de la 3^{ème} analyse, trois milieux supplémentaires sont utilisées : PCA/10+M0, PCA/10+MM et PCA/10+MOM. Nous ajoutons des composants du milieu R2A au milieu PCA/10. Les conditions opératoires requises sont identiques aux précédentes analyses.

Les résultats obtenus sont traités statistiquement avec le test de Student ou celui du χ^2 selon l'existence ou non d'appariement entre les paramètres.

III.3.3.2/ Le dénombrement de cellules viables cultivables (VC)

Dans des conditions classiques, il est effectué sur gélose R2A, après une période d'incubation d'une semaine à 20°C. Pourtant, dans le cas des eaux de griffon Vauban et SDCA, les temps d'incubation peuvent être plus longs et les températures requises sont les températures originelles des forages c'est-à-dire 26°C et 18°C, respectivement.

Les ensemencements sont toujours en surface et les dilutions effectuées dans de l'eau distillée stérile. Ces conditions de cultures résultent d'expériences préliminaires améliorant la mise en évidence de la flore microbienne propre à nos eaux.

III.3.4/ Les cellules viables non cultivables (VNC)

Elles sont mises en évidence par les différences rencontrées entre les mesures sur milieux gélosés et celles en microscopie avec les colorants indicateurs de viabilité.

III.3.4.1/ Les cellules viables respirantes

Le colorant utilisé est un sel de tétrazolium: le chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium (CTC ; réf. Polysciences INC., 19292). Il est utilisé en solution aqueuse à 0,16% (w/v), stérilisée par filtration sur support filtrant de 0,2 μm et conservée à +4°C à l'obscurité.

Des essais sont effectués sur des souches pures ainsi que sur la microflore des eaux minérales fraîchement embouteillées et stockées quelques jours. Des aliquotes de 1 ml de suspensions bactériennes prélevées à différents temps (toutes les 3 heures) sont additionnées de 0,1 ml de solution CTC et placées au bain marie à 30°C pendant 30 minutes. Ces échantillons sont éventuellement dilués afin d'obtenir une concentration compatible avec l'observation microscopique. Une prise d'essai de 0,1 ml est ensuite filtrée sur une membrane Nucléopore. Pour rendre compte de l'efficacité du CTC dans l'évaluation du nombre de bactéries viables, les souches sont mises à différents temps d'incubation: 30 minutes, 1, 2, 4, 6 et 8 h à 30°C. De plus, nous varions le volume de CTC : 0,1 et 0,2 ml. Les lectures se font au microscope à épifluorescence.

III.3.4.2/ Les cellules viables basées sur l'intégrité membranaire

Nous utilisons ici, le Live/Dead. Son mode opératoire est décrit au chapitre III.3.2. Dans le cas présent, seules les cellules vert fluorescent sont considérées dans le dénombrement des cellules viables.

III.3.4.3/ Les cellules viables métaboliquement actives

La technique utilisée «Direct Viable Count» (DVC) est basée sur l'élongation des cellules bactériennes en présence d'inhibiteurs de la réplication

(antibiotique). Elle est modifiée dans notre étude afin de dénombrer et caractériser rapidement en microscopie la microflore des eaux minérales.

III.3.4.3.1/ L'isolement des bactéries d'eaux minérales du griffon

Notre étude porte sur les 2 eaux minérales : Vauban et SDCA. Quinze souches représentatives sont isolées sur R2A puis incubées respectivement à 26°C et 18°C selon la source. Ces souches sont désignées par deux lettres :

- ① la première lettre désigne un type de souche (de A à Z)
- ② la deuxième lettre désigne la source d'origine (v pour Vauban et s pour SDCA)

III.3.4.3.2/ La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Une étude préalable sur les différentes souches permet de déterminer les CMI vis-à-vis d'une famille d'antibiotique (ATB): les (fluoro)quinolones. Les ATB testés sont l'acide nalidixique (AN), l'acide pipémidique (A. PIP.), la ciprofloxacine (CIP), la fluméquine (AR), la norfloxacine (NOR), la pefloxacine (PEF) et l'ofloxacine (OF). Ces antibiotiques ont été préparés dans différents solvants selon leurs caractères de solubilité :

- ① éthanol pour l'OF (SIGMA 0-8757) et la NOR (SIGMA N-9890)
- ② eau pour l'AN (SIGMA N-4382) et la CIP (BAYER PHARMA 2760335)
- ③ solution alcaline (eau + soude) pour l'AR (SIGMA F-7016), la PEF (RHONE POULENC RORER 41982A) et l'A.PIP.(SIGMA P-7903)

La solution mère est à 1 g/l. Une série de dilution est préparée dans du bouillon Mueller Hinton (MH) (réf. Biokar, BK108) : 5 ml de l'antibiotique sont prélevés puis dilués dans 5 ml de bouillon Mueller Hinton (dilution au demi). La concentration finale est de 0,5 g/l. De la même manière, une série de dilutions de raison 2 est effectuée jusqu'à une concentration finale en ATB de 0,49 mg/l.

III.3.4.3.3/ La détermination des caractéristiques géométriques témoins des différentes bactéries

L'objectif est de déterminer la morphométrie des souches cultivées à 25°C dans du bouillon MH après 20 heures d'incubation. Pour cela, nous avons besoin d'un

microscope à épifluorescence et un système d'analyse d'image. Dans cette méthode, les bactéries doivent être auparavant colorées à l'AO afin d'être mises en évidence.

Ces bactéries sont alors filmées à l'aide d'une caméra. L'opérateur photographie un champ microscopique puis le traite sur informatique. A l'aide du logiciel, une coloration monochromatique est pratiquée pour différencier les bactéries du bruit de fond et fixer leur aspect morphométrique.

Les paramètres morphométriques retenus sont:

- ① la surface totale de l'objet en μm^2
- ② la hauteur de l'objet en μm
- ③ la longueur de l'objet en μm

Les deux derniers paramètres sont en fait des projections orthogonales des dimensions de l'objet. D'autres paramètres concernant l'intensité lumineuse sont retenus mais ne rentreront pas dans l'interprétation des résultats.

Les données enregistrées sont traitées sur Excel 6 afin de calculer l'hypoténuse et la projection maximale moyenne des objets.

III.3.4.3.4/ Les colorations

Le Live/Dead est utilisé pour dénombrer les cellules vivantes dans les bouillons de préculture. En revanche, nous utilisons l'AO dans la recherche des cellules allongées sous l'action d'antibiotiques pour dénombrer les bactéries viables métaboliquement actives dans les échantillons de souches pures ou mixtes.

III.3.4.3.5/ Les tests d'élongation des bactéries cultivées en présence de quinolones

III.3.4.3.5.1/ L'étude de l'élongation de la souche d'Ev avec différentes quinolones

La souche Ev est testée avec cinq antibiotiques différents pour étudier les changements des caractéristiques géométriques selon la nature des quinolones. La souche Ev est inoculée dans du bouillon MH contenant la CMI d'un ATB donné. Le milieu était incubé à 25°C et les morphotypes sont déterminés après 14 et 72 heures.

III.3.4.3.5.2/ La détermination de la morphométrie des bactéries inhibées par un antibiotique

Les bactéries isolées sur R2A sont inoculées en bouillon MH pour obtenir une culture jeune. Celles-ci sont incubées à 25°C pendant 20 heures. Sur ces cultures sont déterminés les paramètres géométriques des souches. Ces mêmes cultures serviront à ensemercer, après dilution au dixième dans du bouillon stérile MH, un bouillon contenant un antibiotiques. Ces ATB sont utilisés à des concentrations variables selon la souche. Les différentes CMI obtenues auparavant servent de références pour les tests d'élongation.

Un ml de la culture diluée est additionnée à 1 ml de bouillon MH possédant l'AB testé, à la CMI correspondante. Ces tubes sont alors incubés à 25°C pendant 14 h. A ce stade, un prélèvement de 0,1 ml est effectué. Ce volume permet de déterminer les paramètres morphométriques des cultures inhibées par la quinolone correspondante. Ces mêmes tubes sont à nouveau incubés à 25°C pendant 2 jours. Alors, une nouvelle détermination des paramètres géométriques de la bactérie est effectuée.

III.3.4.3.6/ Le dénombrement et la caractérisation des différentes bactéries constituant une population mixte, par test d'élongation.

III.3.4.3.6.1/ L'essai *in situ* sur l'eau minérale

Après filtration d'un certain volume d'eau minérale, la microflore retenue sur la membrane est remise en culture dans du bouillon MH en présence de ciprofloxacine (inhibiteur le plus puissant). Après 14 heures, la culture est observée au microscope à épifluorescence après filtration et coloration à l'AO.

III.3.4.3.6.2/ Le dénombrement et la caractérisation d'une population bactérienne mixte dans un bouillon riche et dans l'eau minérale, avec une méthode DVC améliorée.

Deux à cinq souches cultivées dans du bouillon MH sont mélangées avec différents cocktails d'antibiotiques. L'incubation était à 25°C pendant 14 h. Nous comptons les bactéries allongées dans chaque expérience, après coloration à l'AO en utilisant une méthode dérivée de Kogure *et al.* (1979). Le choix de l'antibiotique et de sa concentration dans l'analyse dépend de la nature de la souche testée. Pour vérifier l'efficacité et la validité de la méthode, il était utile de connaître la concentration initiale des bactéries

viables de chaque souche dans les mélanges. Cette investigation est réalisée par le colorant Live/Dead (Haugland 1996).

III.3.5/ Les cellules mortes

Elles sont mises en évidence à l'aide du colorant Live/Dead. Elles ont une fluorescence rouge dans les préparations. Mais il est également possible d'obtenir leur dénombrement indirectement, en soustrayant la flore viable à la flore totale.

III.4/ La recherche de procaryotes et de micro eucaryotes dans les eaux de forage

III.4.1/ Les procaryotes

III.4.1.1/ Les bactéries aérobies

La source du Clos de l'Abbaye

Ce forage présente un piquage direct sur la conduite d'extraction. Le prélèvement stérile est facile à réaliser et répond aux exigences requises pour le laboratoire interne. Nous avons procédé aux prélèvements de volumes variés pour évaluer la microflore de façon quantitative.

Le volume à filtrer dans ce cas est important et nécessite l'aide de récipients de 30 litres. En effet, le type de robinetterie et le colmatage progressif du filtre dans le mouchard rendent le débit variable et ne permettent pas la mesure directe du volume prélevé.

Les conditions opératoires requises dans cette analyse pour les deux eaux sont celles utilisées dans les dénombrements des cellules viables et cultivables.

Nous avons par ailleurs modifié le schéma de la filtration, en plaçant parfois deux mouchards en série, l'un comprenant une membrane de porosité 0,45 μm et l'autre de 0,2 μm afin d'évaluer les populations microbiennes en fonction de leur taille.

La source Vauban

Dans le cas de cette source, les premières analyses bactériologiques sont réalisées sur le piquage de référence au niveau duquel les autorités agréées aux contrôles de l'eau effectuent leurs prélèvements. Ce robinet est placé en aval d'une pompe, par conséquent les études bactériologiques sont biaisées par rapport à la composition originelle de l'eau à l'émergence. Le prélèvement est alors effectué avant la pompe de gavage, petite pompe en annexe qui maintient une pression dans le circuit d'eau lors de l'arrêt de la pompe principale.

Dans cette canalisation, l'eau circule régulièrement et aucun process n'a d'impact sur la microflore autochtone.

La microflore aérobie est recherchée dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites dans le dénombrement des cellules viables cultivables (Chap II.3.3.2).

III.4.1.2/ Les bactéries anaérobies

La recherche de ces microorganismes suit plusieurs protocoles. Pour optimiser leur mise en évidence dans un tel environnement, nous avons utilisé différents milieux et diverses techniques:

- ① gélose profonde régénérée Viande-Foie en tube de Veillon
- ② gélose profonde régénérée R2A en tube 20x200
- ③ gélose R2A en boîte de Petri incubées en jarre anaérobie
- ④ bouillon MRS (réf. Biokar, BK070) réduit et dégazé

La filtration de l'eau du griffon sur les « mouchards » dure quelques jours (3 à 5) pour concentrer cette flore microbienne sur les membranes. Cette membrane est récupérée, puis lavée avec 10 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension constitue notre inoculum, à raison d'1 ml par essai (2) et par technique (4). L'expérience est réitérée trois fois à une semaine d'intervalle.

III.4.1.3/ La flore planctonique

La recherche de parasites, d'algues, de protozoaires est réalisée en microscopie directe. Une grande quantité d'eau de forage est filtrée comme dans l'expérience ci-dessus. Après rinçage des supports filtrants avec de l'eau distillée stérile, une centrifugation est effectuée. Le culot obtenu est repris pour une coloration à l'AO et une observation microscopique.

III.4.1.4/ L'investigation de la microflore par la microscopie électronique

Après filtration d'un grand volume d'eau de forage, les bactéries retenues sont reprises dans 10 ml d'eau auxquels sont ajoutés 1 ml d'OSO₄ à 1% dans le tampon Michaelis pH 6 (Ryter-Kellenberger 1958). L'échantillon est ensuite centrifugé à 1500 rpm 10 à 15 min. Le culot est repris dans une quantité égale de gélose « micro » (tryptone 1 g, MgSO₄ 1M 1 ml, saccharose 2M 25 ml/qsp 100 ml + 2 g d'agar Difco ; autoclave 30 min. à 105°C). La gélose contenant le culot est alors étalée sur une lame. Nous procédons alors à la découpe de cubes de 1 mm³ lesquels sont placés dans de OSO₄ à 1% durant une nuit. L'étape

suivante est un bain dans une solution d'acétate d'urane à 1% dans du tampon Michaelis pH 6, pendant 2 h. Enfin, nous procédons à la déshydratation des échantillons par de l'alcool et de l'oxyde de propylène pour ensuite effectuer l'inclusion à l'épon selon Luft (1961).

La polymérisation est faite à 60°C pendant 3 jours. Les coupes sont alors effectuées à l'aide d'un microtome et observées au microscope électronique JEOL 120CX, 80 kv (Université des Sciences et Technologies de Lille).

III.5/ L'évolution de la microflore des eaux de griffon et embouteillées

III.5.1/ La variabilité de la population bactérienne des eaux embouteillées

L'étude porte sur la soutireuse de la chaîne d'embouteillage de la source du Clos de l'Abbaye en PVC, 1,5 litres, ligne n°5. Dix bouteilles ont été prélevées sous un même bec; neuf d'entre eux sont concernés à chaque rotation du groupe : n°20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65.

Les échantillons sont stockés à 20°C à l'obscurité pendant 5 jours afin d'obtenir la population de bactéries viables cultivables maximales. Une étude préliminaire sur l'évolution de la microflore au sein des bouteilles permet d'obtenir cette information. Le dénombrement s'est ensuite effectué en surface (0,1 ml) sur milieu R2A (Reasoner and Geldreich 1985) (Difco, 1826-17-1). Les boîtes de Pétri sont incubées à 20°C dans une étuve thermostatée pendant 1 semaine.

Une étude parallèle porte sur la stérilité des bouteilles plastiques vides avant remplissage. Trente bouteilles ont été examinées. De la gélose PCA (Biokar, BK043) est coulée dans ces bouteilles, lesquelles sont alors incubées à température ambiante pendant trois semaines. Les bouchons sont également testés. Après leur rinçage à l'eau distillée stérile, nous procédons à des filtrations sur membranes d'acétate de cellulose de porosité 0,2 µm. Ces dernières placées sur des géloses PCA, sont ensuite incubées à température ambiante. Enfin, nous procédons à une Analyse en Composante Principale (ACP) sur les numérations des cellules viables cultivables.

III.5.2/ L'évolution des microorganismes viables et cultivables dans les forages

Nous suivons la microflore des deux griffons sur une année complète (96-97) de manière discontinue. Le protocole de numération est précédemment décrit dans le chapitre III.3.3.2.

III.5.3/ L'évolution des micro-organismes des différentes eaux (forage et chaîne) conditionnées dans les bouteilles

1^{ère} étude : Deux lots de 24 bouteilles d'eau de Vauban et de Source du Clos de l'Abbaye sont utilisés pour réaliser une étude sur 24 jours et plus. Des analyses sont réalisées tous les jours pendant les 5 premiers jours (T0 à T4) puis après 8, 13, 23 et 106 jours. A chaque analyse, trois bouteilles de chaque lot subissaient :

① Une filtration (concentration) ; les bouteilles ne sont pas agitées dans cette étude

② Une coloration à l'AO (dénombrement des bactéries totales libres ou adsorbées sur les bouteilles)

③ Un ensemencement sur milieu R2A (dénombrement de bactéries viables libres ou adsorbées sur les bouteilles)

④ Une extraction des Acides Gras (AG) (détermination du profil d'AG de la microflore dans les eaux) (Chap. V.6.2)

La coloration à l'AO des bactéries fixées sur la paroi des bouteilles

Des morceaux de paroi de bouteilles sont découpés à l'aide d'un cutter au niveau de la limite tiers inférieur et sur le fond de la bouteille. La lame de cutter est préalablement passée à la flamme avant chaque découpe pour éviter toute contamination. Les morceaux découpés doivent être suffisamment longs et larges pour tenir sur la lame objet du microscope et permettre une observation satisfaisante.

Quelques gouttes d'AO sont ensuite déposées sur les morceaux de paroi. Le temps de contact est de 3 à 5 min. Le surplus d'AO est retiré à l'aide d'un buvard et la préparation est séchée quelques minutes. Les morceaux de paroi sont alors placés sur des lames en verre et maintenus à l'aide de rubans adhésifs pour être observés sous huile à immersion au microscope à épifluorescence.

Le dénombrement des cellules viables et cultivables

Les différents phénotypes sont dénombrés individuellement ainsi que la population totale. Chacun des phénotypes a fait l'objet d'un repiquage sur R2A et d'une identification sur galerie API 20NE.

L'étude de l'adsorption des bactéries sur les parois plastiques (PET et PVC) d'une bouteille

Des fragments de bouteille découpés comme précédemment sont utilisés pour le dénombrement total des bactéries à différents niveaux et sur 2 types de conditionnement, PET et PVC. D'autres ont servi après vortexage (1 minute) rigoureux dans de l'eau distillée stérile, à déterminer le nombre de cellules totales et celui de cellules viables cultivables faiblement adsorbées aux parois (donc retrouvées dans le surnageant après vortexage), ainsi que la proportion de bactéries totales fortement fixées sur ces plastiques (retrouvées encore sur le plastique).

L'investigation de la microflore adsorbée sur les parois par la microscopie à balayage

Cette microflore des contenants en PVC et en PET est observée sur des languettes de 1 x 0,3 cm, découpées à mi-hauteur (côté) et dans le fond des bouteilles.

La fixation des bactéries est réalisée à l'aide de bain de glutaraldéhyde à 5% avec du rouge de ruthénium 0,15% dans du tampon de cacodylate à 0,0067 M pH 6,2. Ensuite, les préparations sont lavées 3 fois avec du tampon de Sorensen 0,2 M pH 6. La déshydratation à l'alcool est l'étape suivante et est réalisée par des bains successifs :

- ① alcool 50°, 10 min.
- ② alcool 70°, 10 min.
- ③ alcool 96°, 3 x 10 min.
- ④ alcool absolu, 3 x 10 min.

Après le séchage à l'air, la métallisation à l'or est effectuée avant l'observation au microscope électronique JEOL 120CX, équipé du système ASID-4D.

2^{ème} étude : L'eau minérale naturelle utilisée provient exclusivement de la source Vauban.

① deux lots d'échantillons d'eau du griffon dans des bouteilles stériles de 1,5 l en PVC (V1, V2, V3) et PET (V4, V5, V6)

② un lot d'échantillons d'eau embouteillée dans des bouteilles de 1,5 l en PET (V7, V8, V9) prélevé en fin de chaîne de production, ligne 9.

Pour des raisons statistiques, chaque échantillon est prélevé en trois exemplaires. Les échantillons sont stockés aux laboratoires à température ambiante (20°C) pendant 3 mois.

Afin de remettre en suspension les bactéries adsorbées sur les parois, les bouteilles sont vigoureusement agitées avant chaque analyse qui comprend :

- ① coloration à l'AO (dénombrement des cellules totales)
- ② coloration au L/D (dénombrement des cellules viables, mortes et totales)
- ③ ensemencement sur milieu R2A (dénombrement des bactéries VC)

Le dénombrement des cellules viables et cultivables

Les différents phénotypes sont dénombrés individuellement et dans leur totalité, de plus quelques souches font l'objet d'une identification en galerie API 20NE.

3^{ème} étude : Les analyses portent sur des bouteilles exclusivement issues de la ligne 5 de la Source du Clos de l'Abbaye. Les bouteilles sont âgées de 2 à 3 ans et proviennent du site d'archivage. Nous effectuons sur chacune d'elle (73) :

- ① coloration au L/D (dénombrement des cellules viables, mortes et totales)
- ② ensemencement sur milieu R2A (dénombrement des bactéries VC)

III.5.4/ L'étude de facteurs influents sur l'évolution de la microflore des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye

Les essais effectués sont de 2 ordres :

① les premiers portent sur une estimation du comportement des cellules viables cultivables de la flore des eaux de SDCA. Deux campagnes qui sont basées sur l'apport azoté à différentes concentrations, sous forme minérale (NH_4Cl : 0,1 ; 0,5 ; 1,0 g/l) et sous forme organique (peptone : 0,5 ; 1,25 ; 2,5 g/l) ; ainsi que sur l'ajout d'une source carbonée simple (glucose : 0,1 ; 0,5 ; 1,0 g/l) et sur la réduction de l'eau (Na_2S : 62,5 ; 187,5 ; 562,5 mg/l).

Chaque analyse s'effectue sur 6 bouteilles d'1,5 l prélevées en sortie de chaîne, soit un duplicata par concentration. Ces opérations sont exécutées stérilement et en conservant le système «fermé». Pour cela, nous avons procédé à l'ajout de solutions concentrées directement dans les bouteilles à l'aide de seringues stériles.

Trois bouteilles exemptes de traitement (témoin) sont également suivies lors des deux campagnes.

Toutes les bouteilles sont stockées 5 jours dans une étuve thermostatée à 20°C. Le dénombrement des cellules VC est alors réalisé (Chap. III.3.3.2).

② les seconds concernent des bouteilles stockées quelques mois, dans lesquelles sont ajoutées au temps t des peptones à raison d'1 g/l en concentration finale dans la bouteille. Une étude cinétique orientée sur la flore totale (L/D), les cellules VC (R2A), les cellules VNC et les cellules mortes (L/D) est réalisée pendant 55 heures sur un triplicata. L'étude est répétée. Chaque fois, les différents phénotypes basés sur des caractères macroscopiques sont notifiés spécifiquement.

III.6/ La caractérisation et l'identification des bactéries aquicoles isolées des eaux du griffon et des bouteilles

III.6.1/ Le «Nutrient Tolerance» (NT)

Les souches testées sont isolées à partir des eaux du griffon et des eaux mises en bouteille, au niveau des deux sources. Pour le "Nutrient Tolerance", des pré cultures incubées à 20°C dans des bouillons PC/10 pendant un ou plusieurs jours sont inoculées dans des tubes contenant 10 ml de bouillons PC, PC/10 et BHI (Schmidt-Lorenz 1990).

Le test est dupliqué pour chacun des phénotypes isolés. L'incubation est amenée à 20°C. L'apparition d'un trouble visible est régulièrement vérifiée jusqu'au vingt et unième jour : 2 fois/jour au cours des 3 premières journées, puis quotidiennement.

Tableau 4. Composition et quantité de carbone organique dissout (COD) des trois bouillons utilisés dans le test «Nutrient tolerance» (NT).

Ingredient	Concentration (g/l)		
	BHI ^a	PC ^b	PC/10 ^c
Extrait de levure	—	2.5	0.25
Peptone de caséine	—	5.0	0.5
Glucose	2.0	1.0	0.1
Peptone protéasique	10.0	—	—
Infusion de cervelles de veau	200.0	—	—
Infusion de cœur de boeuf	250.0	—	—
Na ₂ HPO ₄	2.5	—	—
NaCl	5.0	—	—
COD	55.0	6.3	0.63

^a BHI = infusion de cœur-cervelle.

^b PC = bouillon normal de 'plate count'.

^c PC/10 = bouillon dilué au 1:10 de 'plate count'.

III.6.2/ Les profils biochimiques

Une étude écologique est réalisée sur 91 isolats. Elle est basée sur la détermination d'un grand nombre de caractères biochimiques ; dans notre cas, cent vingt trois. Ils mettent en évidence des assimilations, des acidifications, des activités enzymatiques... Trois galeries sont utilisées dans cette étude :

- ① galerie API 20NE (bioMérieux, 20050)
- ② galerie BBL CRYSTAL E/NF (Biodis, 104004)
- ③ galerie BIOLOG (AES, 07485) (Bochner 1994)

Sur chaque souche est effectuée :

- ① Examen macroscopique
- ② Coloration de Gram
- ③ Kligler
- ④ Oxydase

Nous testons également quarante souches type.

Tableau 5 : Les souches type utilisées

Souches type	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Shingomonas paucimobilis</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Acidovorax delafieldii</i>
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
<i>Pseudomonas orientalis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Pseudomonas libaniensis</i>	<i>Psychrobacter immobilis</i>
<i>Pseudomonas cedrella</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
<i>Pseudomonas monteilii</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>Myroides odoratus</i>	<i>Acinetobacter genospecies 3</i>

<i>Cytophaga aquatilis</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Acinetobacter junii</i>
<i>Oligella urethralis</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Flavobacterium breve</i>	<i>Acinetobacter genospecies 10</i>
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Alcaligenes faecalis subsp. faecalis</i>
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidans</i>

Les souches sont ensemencées sur gélose au sang (réf. AEB 122870) incubées à 30°C pendant 24 heures. A partir de colonies isolées, les différents inocula de chaque galerie sont préparés dans leur solution correspondante. Les suspensions sont alors réparties dans les cupules des trois galeries. Celles-ci sont alors incubées à 30°C dans une étuve thermostatée et saturée en eau, pour éviter une déshydratation trop rapide des cupules et permettre une augmentation du temps d'incubation :

- ① 48 à 72 h pour les galeries API 20NE
- ② jusqu'à 5 jours pour les galeries BBL Crystal E/NF
- ③ jusqu'à 8 jours pour les galeries BIOLOG

Tous les résultats sont analysés statistiquement. Un dendrogramme avec l'indice de Jackard est établi (par Mlle Membré, INRA, Villeneuve d'Ascq), un autre selon les distances Euclidiennes.

Tableau 6: Caractères biochimiques testés sur les isolats des eaux minérales embouteillées

<i>Galerie API 20NE</i>			
Nitrate	Tryptophane	Glucose (fermentation)	Arginine dihydrogénase
Urease*	Esculine*	Gélatine	Oxydase
Glucose [§]	Arabinose* [§]	Mannose* [§]	Mannitol* [§]
N-acetyl-glucosamine* [§]	Maltose [§]	Gluconate [§]	Caprate
Adipate	Malate	Citrate* [§]	Phényl-acétate
Para-nitro-phényl-β-D-	galactopyranoside*		

Galerie BBL crystal

Sucrose [§]	Mélibiose [§]	Rhamnose	Sorbitol [§]
Adonitol [§]	Galactose [§]	Inositol [§]	p-nitrophényl phosphate
p-nitrophényl α -(béta) glucoside	Nitroanidine proline	p-nitrophényl bis phosphate	p-nitrophényl xyloside
p-nitrophényl α - arabinoside	p-nitrophényl phosphorylcholine	p-nitrophényl- β - glucuronide	γ -L-glutamyl p- nitroanidine
p-nitro-DL-phénylalanine	Glycine	Malonate [§]	Tétrazolium
Arginine	Lysine		

Galerie BIOLOG GN

α -Cyclodextrine	Dextrine	Glycogène	Tween 40
Tween 80	N-acétyl-D-galactosamine	L-Arabinose	Cellobiose
L-Erythritol	L-Fucose	L-Fructose	Gentiobiose
α -Lactose	α -D-Lactose lactulose	methyl-glucoside	Psicose
D-Raffinose	L-Mannose	D-Tréhalose	Furanose
Xylitol	méthyl pyruvate	monométhyl succinate	Acide acétique
Acide cis-aconitique	Acide formique	Acide D-galacturonique	Acide D-glucosaminique
Acide D-glucuronique	Acide α -hydroxy - butyrique	Acide β -hydroxy - butyrique	Acide γ -hydroxy - butyrique
Acide p-hydroxy- phénylacétique	Acide laconique	Acide α -céto-butyrique	Acide α -céto-glutarique
Acide α -céto-valérique	Acide D,L-lactique	Acide propionique	Acide quinique
Acide D-saccharique	Acide sébacique	Acide bromo-succinique	Acide succinique
Acide succinamique	Glucuronamide	Alaninamide	D-Alanine
L-Alanine	L-alanyl-glycine	L-asparagine	Acide L-aspartique
Acide L-glutamique	Acide Glycyl-L-aspartique	Acide glycyl-L- glutamique	L-Histidine
Hydroxy-L-proline	L-Leucine	L-Ornithine	L-phényl-alanine
L-Proline	Acide L-pyro-glutamique	D-Sérine	L-Sérine
L-Thréonine	D,L-Camitine	Acide γ -amino-butyrique	Acide urocanique
Inosine	Uridine	Phényl éthylamine	2-amino-éthanol
2,3-butanediol	Glycérol	D,L- α -glycérol phosphate	Glucose-1-phosphate
Glucose-6-phosphate			

* rencontré également dans la Galerie BBL crystal

§ rencontré également dans la Galerie BIOLOG GN

III.6.3/ Les profils d'Acides Gras (AG)

Les isolats sont ensemencés sur Trypticase Soja Agar (TSA) (bioMérieux, 51044) et incubés 24 h à 30°C. Chaque analyse est tripliquée et tous les isolements servent à l'établissement d'un profil d'AG. L'expérience est également réalisée sur les souches type présentées précédemment.

Les profils d'AG sont exploités par une Analyse en Composante Principale (ACP) (Mille Membre, INRA, Villeneuve d'Ascq).

IV/ L'innocuité des eaux minérales

IV.1/ La multirésistance des bactéries aquicoles

IV.1.1/ L'échantillonnage et le dénombrement

Six bouteilles d'eau minérale naturelle plate des deux sources sont prélevées sortie chaîne. Elles sont stockées 5 jours (pic de croissance) à 20°C. Un dénombrement sur chacune des bouteilles est effectué sur R2A et PCA. Les températures d'incubation sont de 20 et 37°C, avec un temps d'incubation de 24 à 72 h.

IV.1.2/ L'isolement

Cent souches isolées, représentant tous les phénotypes rencontrés dans les eaux, sont sélectionnées sur R2A.

Ensuite après repiquage, les microorganismes capables de croître en 24 h sur Mueller Hinton (MH) (bioMérieux 51075) et de former un tapis sont retenus. Ainsi, seulement 17 souches ont fait l'objet d'une étude approfondie sur la résistance aux antibiotiques. Deux autres souches sur 21 isolées en parallèle des eaux de griffon présentent les mêmes exigences de croissance et ont été intégrées à l'étude.

IV.1.3/ L'identification

Les isolats sont identifiés grâce à un examen macroscopique, à la coloration de Gram, à la mobilité, au test oxydase, au caractère fermentatif du glucose ainsi qu'à l'aide d'une galerie API 20NE.

IV.1.4/ L'étude de la résistance aux ATB

La recherche d'antibiorésistance des isolats concerne une soixantaine d'antibiotiques soit quinze classes (Tableau 7).

Tableau 7: Antibiotiques (famille, nom, abréviation, quantité) et mode d'action

Familles	Antibiotiques (Abréviation) ($\mu\text{g}/\text{disque}$)	Mode d'action
Céphalosporine 1^{ère} génération	Cefazoline (CZ) (30) Céfalotine (CF) (30)	<u>Inhibe la synthèse de la paroi bactérienne</u> en agissant sur la réaction de transpeptidation
Céphalosporine 2^{ème} génération	Cefalexine (CN) (30) ^o Cefoxitine (FOX) (30) Cefamandole (MA) (30)	
Céphalosporine 3^{ème} génération	Cefuroxime (CXM) (30) Ceftazidime (CAZ) (30) Cefotaxime (CTX) (30) Cefopérazone (CFP) (30) Cefixime (CFM) (10) Cefsulodine (CFS) (30) Ceftriaxone (CRO) (30)	
Céphalosporine « apparenté »	Aztreonam (ATM) (30) ^o	
Quinolones	Acide pipémidique (PI) (20) Fluméquine (AR) (30) Norfloxacine (NOR) (5) Ofloxacine (OFX) (5) Acide nalidixique (NA) (30) Pelloxacine (PEF) (5) Ciprofloxacine (CIP) (5)	<u>Inhibe l'ADN gyrase (Topoisomérase2)</u> , ce qui <u>bloque la réplication et la réparation de l'ADN</u>
Pénicillines	Pipéracilline (PIP) (75) Azlocilline (AZ) (75) Amoxicilline et Acide clavulanique (AMC) (30) Mecillnam (MEC) (25) Mezlocilline (MZ) (75) Pénicilline G (P) (6) Ampicilline (AM) (10) Amoxicilline (AMX) (25) Carbenicilline (CB) (100) Imipénème (IPM) (10) Ticarcilline et Acide clavulanique (TIM) (85) Meticilline (DP) (5) Oxacilline (OX) (5) Ticarcilline (TIC) (75)	<u>Inhibe la synthèse de la paroi</u> car inhibe l'enzyme qui catalyse la réaction de transpeptidation, bloquant ainsi la synthèse du peptidoglycane
Sulfamides	Sulfamides (G) (25) Triméthoprime et Sulfamides (SXT) (1,25 + 23,75)	Entre en compétition avec l'acide para-aminobenzoïque participant à la synthèse de l'acide folique qui est nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques donc <u>inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN</u>
Macrolides « vrais »	Spiramycine (SP) (100) Oleandomycine (OL) (15)	<u>Inhibe la synthèse protéique</u> en se fixant sur l'ADN 23 S de la sous-unité 50 S du ribosome, bloquant l'élongation de la chaîne polypeptidique
Macrolides « apparentés »	Erythromycine (E) (15UI) Lincomycine (L) (15) Clindamycine (CC) (2) Virginiamycine (SA) (15) Pristinamycine (PR) (15)	
Polypeptide	Colistine (CL) (50) Polymyxine (PB) (30)	Se lie et <u>interfère sur la perméabilité de la membrane cytoplasmique</u>
Tétracyclines	Tétracycline (TE) (18) Minocyclines (MI) (30) Doxycycline (D) (30)	<u>Inhibe la synthèse protéique</u> en se fixant sur la sous-unité 30 S du ribosome, empêchant la fixation de l'ARNt-A.A. sur le site A
Rifamycine	Rifampicine (RA) (30)	Se lie à la sous-unité β de la transcriptase donc <u>inhibe la transcription</u>
Aminosides	Amikacines (RN) (30) Streptomycine (S) (10) Tobramycine (NN) (10) Gentamycine (GM) (10) Netilmycine (NET) (30) Neomycine (N) (30) Dibécacine (DKB) (10)	Se fixe à la sous-unité 50S du ribosome donc <u>inhibe la synthèse protéique et provoque des erreurs de lecture</u>
Nitrofurane	Furane (FM) (300)	<u>Inhibe la réplication de l'ADN</u>
Phénicol	Chloramphénicol © (30)	Se fixe sur l'ARN 23 S de la sous-unité 50 S du ribosome,
Quinolone	Nitroxoline (NI) (20)	<u>inhibe la peptidyltransférase</u> , ce qui <u>empêche la synthèse protéique</u>

Glycopeptides	Vancomycines (VA) (30)	<u>Inhibe la synthèse de la mureine donc de la paroi</u>
Groupes particuliers	Acide fusidique (FA) (10)	Séquestre le facteur d'élongation et <u>inhibe la synthèse protéique</u>
	Fosfomycine (FFL) (50)	<u>Inhibe la synthèse de la mureine donc de la paroi</u>

Pour l'antibiogramme, le milieu utilisé est le Mueller Hinton reconnu comme le milieu de référence. Avant utilisation, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 30 minutes afin d'éliminer l'excès d'humidité et ramener le milieu à la température d'incubation. Les antibiotiques sont conditionnés en disques de papier absorbant de 6 mm de diamètre, dans des cartouches (bioMérieux). L'inoculum est obtenu à partir de 4 à 5 colonies bien isolées sur R2Aensemencées dans 10 ml de bouillon Trypticase Soja (bioMérieux 51019). Il est mis à incuber à 37°C pendant 20 h. Nous utilisons la méthode par inondation. Quelques millilitres de la dilution sont versés sur la gélose de façon à recouvrir la surface. L'excès est ensuite aspiré dans sa totalité. Les boîtes sont alors séchées 15 minutes à 37°C. Les disques sont ensuite déposés à l'aide d'un distributeur (BBL) de 12 cartouches et les boîtes sont incubées à 37°C, 18 à 24 h. Une étude statistique est menée sur les données obtenues. Le logiciel STAT.ITCF est utilisé afin de calculer les pourcentages de résistance envers les différentes familles d'antibiotiques testées et d'élaborer une troncature basée sur les profils de résistance.

IV.1.5/ La recherche de plasmide

Elle s'effectue par électrophorèse réalisée en gel d'agarose à 0,8% préparé dans le tampon TBE (Tris 89 mmol/l, borate 89 mmol/l, EDTA 25 mmol/l) pH 8,3. Le gel est coulé entre deux plaques de verre dépoli, épaisseur 3 mm. L'échantillon est préparé ainsi :

Nous ajoutons un volume de T₅₀E₂₀ pH 8,0 à l'équivalent de 0,25 ml de culture bactérienne parvenu en phase stationnaire de croissance. Après agitation au vortex, les bactéries sont centrifugées pendant 10 min. à 7000 tr/min. à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 60 µl de tampon de lyse constitué de TBE contenant 25% de saccharose, 12% de Ficoll 400, 5 U/ml de RNase A et de 1 mg/ml de lysozyme, puis placé dans la glace fondante pendant 15 minutes. Vortexé pendant 15 secondes toutes les 2 minutes, le mélange parfaitement homogène, est alors déposé dans les alvéoles du gel. Les échantillons sont alors recouverts de 90 µl de TBE gélosé contenant 1% de SDS à 0,05% de bleu de bromophénol et 0,4% d'agarose. L'électrophorèse est verticale, la migration s'effectue en deux temps, 1h30 à 20 Volts puis 4h30 à 80 Volts. Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel est coloré par

immersion dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml pendant 30 minutes, puis décoloré pendant 2 h dans l'eau distillée. Le gel est alors déposé sur un transilluminateur qui permet de visualiser les bandes d'ADN sous un éclairage UV à 312nm.

IV.2/ La contamination des eaux minérales par *Enterococcus faecalis*

Les expériences sont réalisées sur les 2 eaux minérales. Les eaux contaminées sont de différentes natures :

- ① Vauban ou SDCA
- ② forage ou embouteillée
- ③ filtrée et/ou stérilisée ou sans traitement

Deux lots de témoins d'eaux minérales reconstituées sont également examinées. Dans un cas, la composition minérale est calquée sur Vauban, dans l'autre cas elle l'est sur SDCA. Nous utilisons une eau milliQ comme solvant. La matière organique contenue dans nos eaux minérales aux environs de 0,1 mg/ml est simulée dans ces échantillons par l'adjonction d'une solution glucosée stérile.

Les eaux Vauban sont conditionnées dans des bouteilles de PET et celles de SDCA dans des bouteilles de PVC (Stérilité machine). La filtration s'effectue sur les membranes filtrantes d'acétate de cellulose et la stérilisation est effectuée dans des bouteilles en verre par autoclavage à 110°C pendant 30 min.

La culture de *Enterococcus faecalis*, après avoir estimé antérieurement sa correspondance entre Unité Formant Colonie (UFC) et Densité Optique (DO) à 600 nm, est inoculée à raison de 10² et/ou 10³ bactéries viables cultivables /ml dans les bouteilles. Le milieu de culture est du bouillon ordinaire (peptone 5 g/l, extrait de viande 1 g/l, extrait de levure 2 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,4), l'incubation est d'environ 24 h à 30°C.

Suite à l'addition de la souche *E. faecalis*, le dénombrement en masse des entérocoques sur gélose Bile Esculine Azide (BEA, Biokar BK016), est effectué quotidiennement les cinq premiers jours et après une semaine. L'incubation à 30°C dure de 2 à 3 jours permettant un compromis entre un temps maximal d'incubation pour la croissance des microorganismes stressés et une lecture difficile due à la diffusion du pigment issu de l'hydrolyse de l'esculine dans le milieu BEA.

Les dénombrements des cellules viables et mortes sont réalisés selon le protocole du L/D sur chacune des bouteilles contaminées. Plus d'une semaine après la contamination, une série de

chaque type de bouteille reçoit une solution peptonée pour atteindre 3 g/l dans les bouteilles, une seconde reçoit du glucose à raison d'1 g/l. Les différentes numérations sont alors reprises. L'ajout de peptones dans une nouvelle série contaminée, après une semaine d'incubation supplémentaire des bouteilles, a subi les mêmes examens.

V/ La recherche de bio marqueurs (Acides Gras) dans les eaux minérales

V.1/ L'extraction d'acides gras

Préparation de l'échantillon : Dans le cas des eaux minérales, la biomasse étant très faible, il est nécessaire de filtrer de grands volumes. Les bactéries retenues sur les filtres sont lessivées avec de l'eau distillée stérile (10 ml). Ce volume est transféré dans des tubes pyrex pour l'extraction d'AG, munis de bouchon en téflon. Après centrifugation à 3220 g pendant 15 minutes, le surnageant est éliminé et le pseudo culot peut être utilisé.

Dans le cas de culture en bouillon, seule l'étape de centrifugation est nécessaire et pour celui de culture en gélose, il suffit de prélever des colonies et de les transférer dans ces tubes.

L'extraction : Cette opération sert à l'analyse en CPG du profil d'acides gras des bactéries. La manipulation s'effectue en quatre étapes (Miller and Berger 1985):

① La saponification

Une base forte (hydroxyde de sodium) (0,3 g/l) méthanolée (V/V), combinée à la température de 100°C pendant 30 minutes lyse les cellules bactériennes. Les acides gras sont hydrolysés à partir des lipides cellulaires et sont convertis en sels de sodium.

② La méthylation

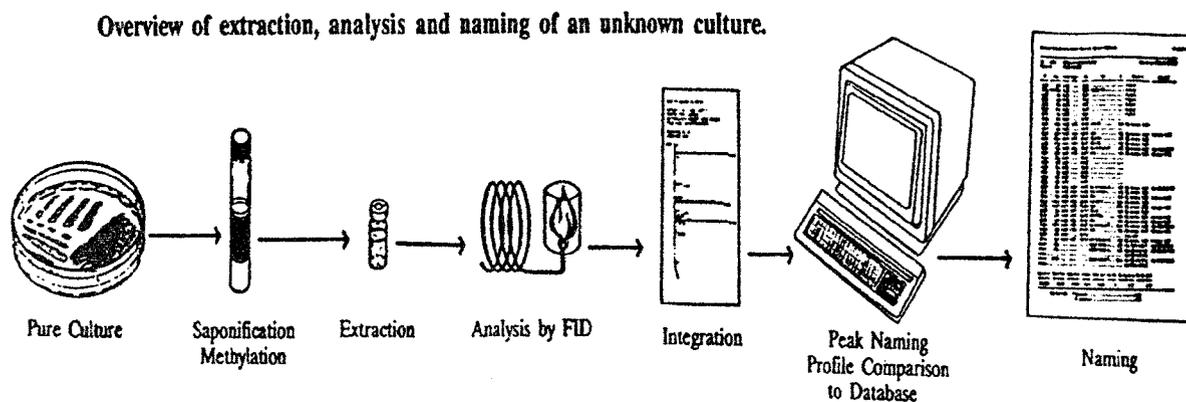
La méthylation transforme ces sels disodiques en esters méthylés d'acides gras. Cette opération augmente la volatilité des acides pour l'analyse en CPG. Cette manipulation requiert une température de 80°C pendant 10 minutes et un acide fort (acide chlorhydrique) (6 M) méthanolé (V/0,8V).

③ L'extraction

Les esters méthylés d'acides gras sont éliminés de la phase aqueuse acide et transférés dans une phase organique par extraction liquide-liquide. Le solvant organique utilisé est un mélange (V/V) d'hexane et de méthyl-tert butyl éther.

④ Lavage

Cette étape est réalisée par une extraction liquide-liquide (NaOH-Hexane). Elle permet d'éliminer les acides gras libres et les réactifs résiduels de la phase organique. Ces derniers pourraient s'avérer néfastes pour l'analyse en CPG. L'échantillon est ensuite séché sous flux d'azote puis stocké en chambre froide à -20°C et à l'obscurité. L'analyse se fera après reprise



de l'échantillon dans un volume de $50\ \mu\text{l}$ d'hexane et injection d' $1\ \mu\text{l}$ dans la colonne capillaire de la CPG/SM.

Figure 11 : Extraction, analyse, et identification d'une culture pure

V.2/ La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

V.2.1/ La définition

La chromatographie est avant tout une méthode « séparatrice », avec la possibilité d'identification. A l'inverse, la spectrométrie de masse est une méthode essentiellement d'identification, mais qui peut également être employée à des fins de séparation temporelle d'échantillons mélangés. Le couplage CPG/SM réunit le meilleur de ces deux méthodes analytiques puissantes. La chromatographie en phase gazeuse est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans être dégradés. Elle permet ainsi l'analyse des mélanges éventuellement très complexes de nature et de volatilité très diverses. Son domaine essentiel est l'analyse des composés organiques. Elle donne lieu néanmoins à des applications importantes en chimie inorganique.

L'instrument qui permet la mise en œuvre de la chromatographie en phase gazeuse, le chromatographe, réalise à la fois la séparation des constituants de l'échantillon et la mesure des quantités de produits séparées. Enfin, une qualité essentielle de la

chromatographie en phase gazeuse moderne tient à la possibilité d'opérer sur de très petites quantités, de l'ordre du milligramme voire même de concentration inférieure.

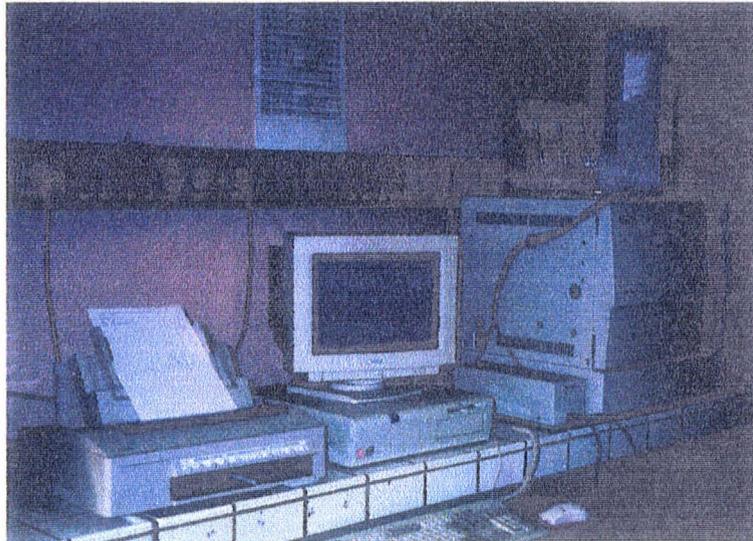


Photo 22 : Chromatographe GC17-A couplée au spectromètre de masse QP-5000

V.2.2/ Le principe

La CPG/SM permet la séparation de différents constituants et leur analyse directe.

L'appareil est constitué des éléments suivants :

- ① Le chromatographe consiste en un dispositif d'introduction des échantillons dilués par le gaz vecteur dans une colonne capillaire.
- ② L'interface qui permet de raccorder le chromatographe au spectromètre de masse.
- ③ La source dans laquelle les molécules sont ionisées en mode IE (Impact Electronique).
- ④ L'analyseur, où les ions sont séparés en fonction de leurs rapports m/z
- ⑤ Le détecteur qui transforme les courants d'ions en signaux électriques mesurables par une chaîne d'acquisition et de traitement (ordinateur).

Le cœur du chromatographe est la colonne. C'est un tube plus ou moins perméable aux gaz qui renferme une substance active, solide ou liquide, appelée phase stationnaire. La colonne est balayée en permanence par un gaz appelé gaz porteur (ou gaz vecteur).

Le processus chromatographique est discontinu. A l'instant initial, l'échantillon est introduit en tête de colonne. Dans le cas le plus fréquent, celui d'un échantillon liquide volatil, cette introduction prend la forme d'une injection au moyen d'une micro seringue à travers une pastille de «caoutchouc» appelée septum, dans une petite chambre située en amont de la colonne sur le circuit de gaz appelé injecteur. Cette chambre est portée à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. La séparation des différents constituants du mélange se fait par la différence d'affinité de leurs molécules pour la phase stationnaire de la colonne.

Ensuite, les molécules passent dans le bloc source où elles sont ionisées en mode IE, puis au niveau de l'analyseur à champ quadripolaire. Les ions sont séparés en fonction de leurs rapports masse/charge (m/z), par l'action combinée d'une tension continue et d'une tension périodique dans les filtres de masse.

Un détecteur à la sortie de la colonne permet de déterminer le temps de rétention des constituants et leur quantité dans le mélange.

Un enregistreur permet de tracer le chromatogramme sous forme de pics dont l'aire correspond à la quantité de chaque constituant, le temps de rétention pour chacun d'entre eux permet de caractériser qualitativement les constituants du mélange.

Il est impératif que la température de la colonne soit contrôlée pour éviter tout écart au niveau des temps de rétention. De même, la vitesse du gaz porteur, dont dépend la largeur des pics, doit être contrôlée et régulée pour avoir une bonne reproductibilité.

A l'exception du chromatographe, les autres régions sont sous vide. L'analyseur et le détecteur sont généralement enfermés dans la même enceinte, désignée par «enveloppe de l'analyseur».

L'atmosphère de la source et de l'analyseur doit être évacuée en permanence par un dispositif de pompage pour le vide. Ses performances ont une influence prépondérante sur les possibilités analytiques de la CPG/SM.

La mesure des surfaces de pics et le calcul des pourcentages relatifs des différents constituants de l'échantillon sont réalisés par un logiciel informatique.

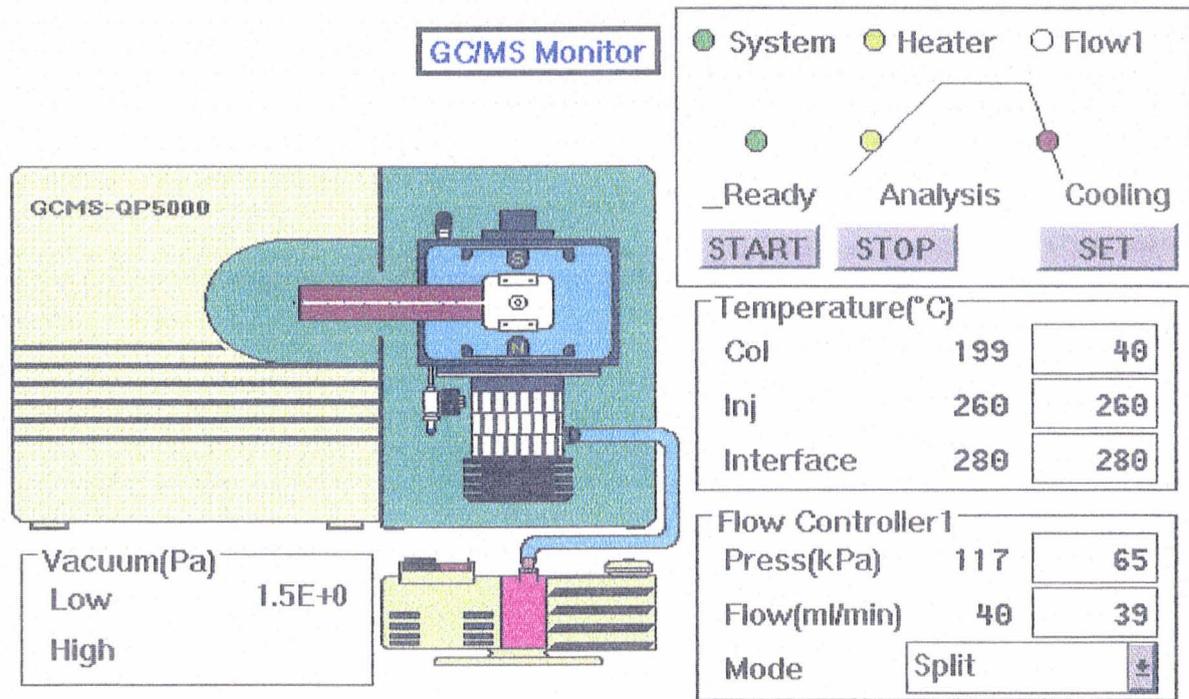


Figure 12 : Schéma du Chromatographe Gaz / Spectromètre de Masse (CPG/SM)

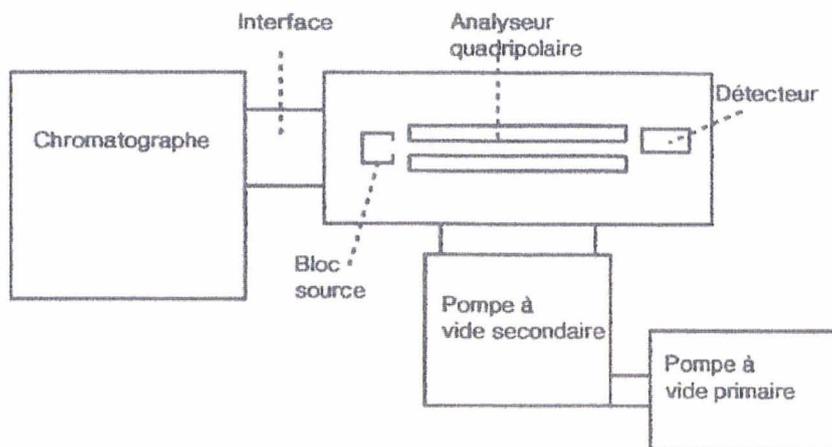


Figure 13: schéma des principales régions d'une CPG/SM à filtre quadripolaire à simple pompage du vide

V.2.3/ L'utilisation de la CPG/SM

Le chromatogramme et les spectres de masse sont analysés par le logiciel informatique qui permet d'intégrer et d'identifier les pics obtenus. Les chromatogrammes et les rapports sont ensuite sortis sur imprimante. Les résultats obtenus sont qualitatifs et quantitatifs (pourcentage relatif).

L'identification des acides gras repose sur les temps de rétention des pics ainsi que sur les spectres de masse. Nous utilisons pour cela des standards de différentes natures: acides gras insaturés, saturés, méthylés, hydroxylés...

Le programme appliqué est le suivant :

Température du four	40°C
Temps d'équilibre du four	2 min.
Température de l'injecteur	260°C
Température interface	280°C

Split	
Pression de la colonne	65,3 kPa
Débit de la colonne	1,2 ml/min.
Vélocité linéaire	40
Split ratio	31
Débit total	39,6 ml/min.

Four			
	Taux d'augmentation de température (°C/min.)	Température (°C)	Temps (min.)
0	-	40	10
1	5,0	160	0
2	3,0	220	0
3		0	0
4		0	0
Temps du programme : 54 minutes			

V.3/ La sensibilité de la technique

La détermination de la sensibilité de notre méthode analytique est importante. L'étude des bactéries en milieu oligotrophe nous fournit une quantité réduite de matériel à analyser (bactéries... acides gras).

Il est donc intéressant d'estimer la sensibilité de l'appareil et de la quantifier en nombre de bactéries. Ceci nous sert dans nos investigations pour connaître nos limites et adapter nos modes opératoires afin d'obtenir des résultats interprétables.

L'expérience porte sur une souche isolée et identifiée comme *Pseudomonas fluorescens*. Une culture en bouillon est diluée dans de l'eau physiologique stérile (10^{-1} à 10^{-5}). Sur chaque dilution, un dénombrement en surface (0,1 ml sur R2A) et une extraction d'AG (1 ml) sont effectués. Chaque échantillon est ensuite analysé en Chromatographie gazeuse.

V.4/ L'étude des profils d'Acides Gras totaux des eaux minérales (griffon et bouteille)

V.4.1/ L'étude de la stabilité du profil d'Acides Gras d'une communauté bactérienne issue d'eaux minérales naturelles

Nous prélevons des échantillons d'eaux embouteillées de Vauban et de SDCA.

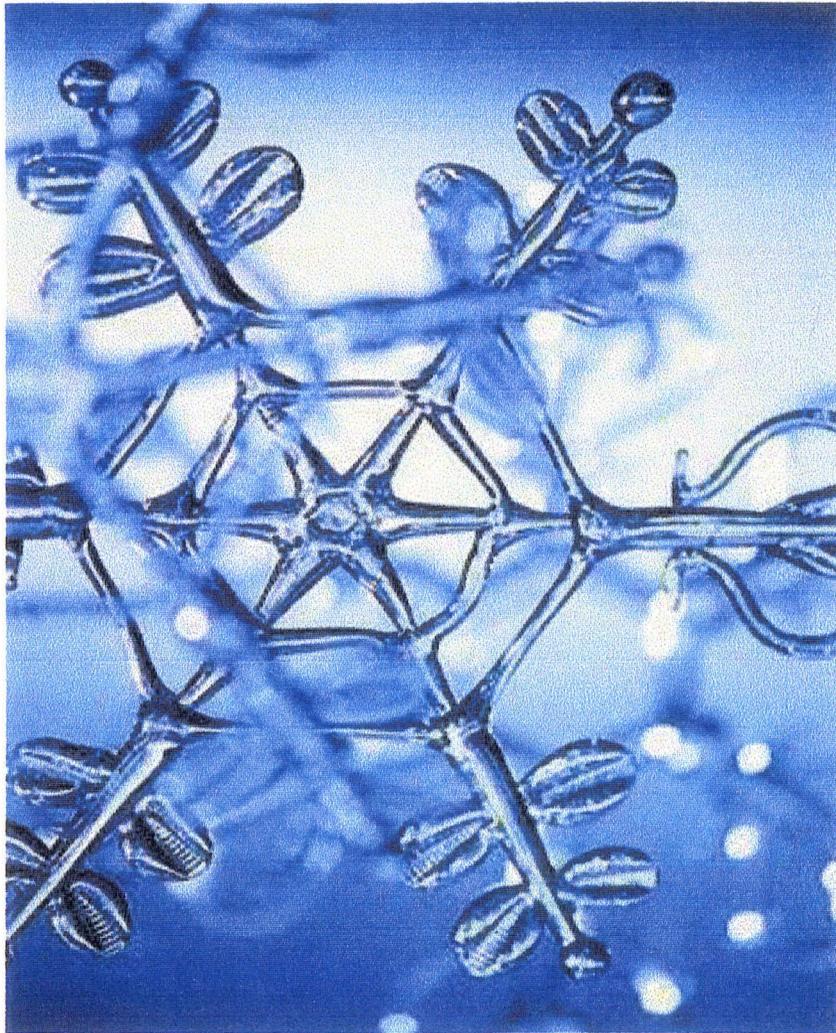
Nous avons besoin périodiquement d'un volume de 1,5 litres d'eau, en trois exemplaires pour chaque source afin d'obtenir un profil moyen représentatif. Ces échantillons sont stockés à température ambiante (20°C) et à l'obscurité.

V.4.2/ L'étude du profil d'Acides Gras des isolats aquicoles

Le profil d'Acides Gras global des eaux minérales testées est réalisé périodiquement dans le temps et sur les deux eaux étudiées.

En parallèle, les différents phénotypes macroscopiques rencontrés sont identifiés, dénombrés puis caractérisés par leurs profils d'Acides Gras après une culture de 5 jours dans de l'eau stérile (15 litres) ou de 24 heures sur milieu R2A. Chaque souche testée est cultivée dans l'eau dont elle est issue : Vauban ou SDCA.

L'extraction d'AG est réalisée après un temps de croissance de 24 h sur le milieu gélosé et 5 jours dans les eaux correspondantes.



RESULTATS & DISCUSSION

*« L'eau peut agir sans poisson,
mais le poisson ne peut agir sans eau »*

Lao tseu (fin de VI^{ème} – début du V^{ème} siècle av. J.-C.) Ibid. XXXIV

I/ La microflore des eaux minérales des griffons de la Source Vauban et de la Source du Clos de l'Abbaye

I.1/ Recherche de protozoaires, d'algues et d'indicateurs de contamination fécale dans les échantillons

Tous les échantillons d'eau des deux forages sont exempts de germes anaérobies, d'algues et de protozoaires (Tableau 8).

De plus, nous ne rencontrons jamais de coliformes, d'Entérocoques, de levures ni de moisissures lors d'analyses parallèles effectuées au sein du laboratoire interne de l'entreprise (données non communiquées).

I.2/ Dénombrement des cellules viables et des cellules cultivables dans l'eau minérale à l'émergence

Les différences dans les populations bactériennes observées dans les forages Vauban et Source du Clos de l'Abbaye entre janvier 1996 et juin 1997 sont indiquées dans la Figure 14. Les dénombrements moyens des colonies pour chaque site pendant la période indiquée ci-dessus sont respectivement de 5 et $7 \cdot 10^{-1}$ UFC/ml.

Les deux sources donnent des dénombrements de cellules viables et cultivables compris entre 10^{-2} et $1,5 \cdot 10^1$ UFC/ml. Dans la plupart des cas, il y a peu de différence dans les numérations des réplicats de chaque échantillon d'eau, ce qui n'est pas retrouvé entre les deux eaux analysées et les différents mois étudiés. Nous n'observons pas de variations saisonnières dans le dénombrement microbien des eaux minérales naturelles étudiées provenant de la région Nord/Pas-de-Calais, malgré des oscillations observées dans les deux forages pendant la période comprise entre janvier 1996 et juin 1997 (Figure 14).

Les bactéries cultivables sont très petites et capables de filtrer à travers des membranes de porosité égale à $0,45 \mu\text{m}$ (Tableau 8). La proportion de ce type de bactéries est plus importante dans les eaux de la Source du Clos de l'Abbaye que dans celle de Vauban.

Les dénombrements des cellules colorées au Live/Dead des eaux de sources Vauban et Clos de l'Abbaye donnent respectivement 74 et 2 cellules viables par ml lesquelles sont colorées en vert, 20 et 11 cellules mortes par ml, ces dernières sont colorées en rouge.

Tableau 8 : Dénombrement de la microflore appartenant à deux eaux minérales françaises (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Dénombrement moyen (ml⁻¹)	Eau à l'émergence	
	Vauban (26°C)	SDCA (18°C)
<i>Cellules totales</i>	94 ± 23*	13 ± 6
<i>Cellules viables</i>	74 ± 15	2 ± 4
<i>Cellules mortes</i>	20 ± 11	11 ± 8
<i>Cellules cultivables aérobies</i>	4,9 ± 3,6	0,7 ± 1,0
<i>Cellules cultivables anaérobies</i>	-	-
<i>Flore planctonique</i>	-	-
<i>% de microcellules[§] viables et cultivables</i>	11	29

[§] rapport entre le nombre de cellules retenues à 0,2 µm et le nombre de cellules retenues à 0,45 µm (x100).

* écart type (n=112 essais sur 1,5 an)

I.3/ Examen en microscopie électronique de la microflore du forage Vauban

La plupart des bactéries observées ont des structures externes similaires à celles des bactéries à Gram négatif, fréquemment rencontrées dans les eaux (Guillot et Leclerc 1993). Cependant, nous trouvons également des formes atypiques de bactéries que nous rapportons dans la planche photographique 23. En effet, nous observons des gangues autour de certains micro-organismes (Photo 23.5), des bactéries allongées et (ou) déformées (Photos 23.1, 23.2 et 23.4). Nous mettons également en évidence des structures fibrillaires sur la surface bactérienne (Photo 23.3).

I.4/ Identification des souches isolées des deux eaux minérales au niveau du griffon

Cinquante six souches représentatives de la population bactérienne des griffons, isolées sur milieu R2A, sont tous des bâtonnets à Gram négatif, non fermentant le glucose et à l'exception d'une souche, oxydase positive (Tableau 9). Parmi ces micro-organismes, *Brevundimonas*, *Burkholderia* et *Sphingomonas* constituaient les genres numériquement dominants. Le groupe qui compte la plus forte quantité d'isolats (29 sur 56 isolats) est représenté par des espèces anciennement (*sensu lato*) ou encore apparentées (*sensu stricto*) au genre *Pseudomonas*. Ces dernières espèces oxydatives rencontrées dans les forages sont *Pseudomonas fluorescens* (5,5%), *Ps. alcaligenes* (3,6%), *Ps. putida* (1,8%) et *Ps. aeruginosa* (1,8%). Les anciennes espèces de *Pseudomonas sp.* étaient classées comme *Brevundimonas vesicularis* (16,4%), *Burkholderia cepacia* (16,4%) et *Sphingomonas paucimobilis* (14,5%). Plusieurs espèces sont isolées dans chaque source et concernent essentiellement les espèces retrouvées majoritairement. D'autres souches (56% des souches) en revanche, étaient seulement isolées dans l'un ou l'autre forage, Vauban ou Source du Clos de l'Abbaye (par exemple, *Acinetobacter lwoffii*, *Ochrobactrum anthropi* et *Alcaligenes faecalis*). Le système API 20NE donne 55% des identifications avec un pourcentage supérieur à 93%. Ces résultats concernent essentiellement le groupe des *Pseudomonas sensu lato* et *sensu stricto* ainsi que les genres *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Chryseobacterium*, *Chryseomonas*, *Acinetobacter* et *Stenotrophomonas*. L'identification apparaît plus difficile pour les isolats des eaux de la Source du Clos de l'Abbaye.

I.5/ Discussion

Les différents types (viabiles, cultivables...) bactériens que l'on peut rencontrer dans les eaux minérales dépendent largement des techniques de cultures utilisées. Afin de mettre en

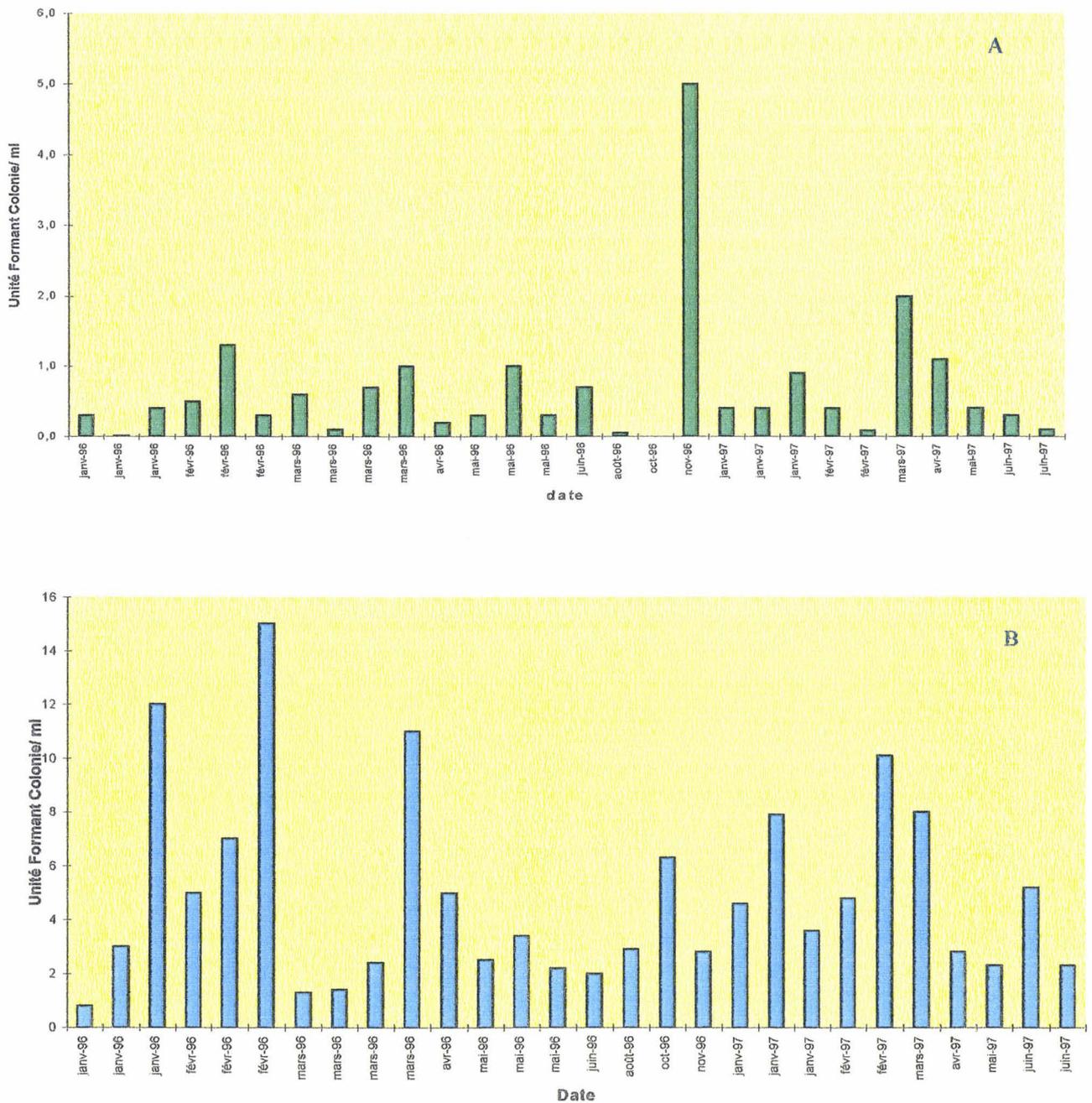


Figure 14: Evolution de la population cultivable sur R2A rencontrées dans deux eaux minérales françaises à l'émergence (A, Source du Clos de l'Abbaye et B, Source Vauban) au cours d'une année.

Ces résultats représentent la moyenne de trois à cinq échantillons (n=3 à 5) par test avec un écart type (σ) inférieur à 5% de la valeur expérimentale

Tableau 9: Identification de souches bactériennes représentatives et isolées à partir de deux eaux minérales à l'émergence (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye) après un examen ponctuel de tous les clones obtenus sur un échantillon filtré sur membrane de porosité 0,2 µm et déposé sur gélose R2A.

Identification avec le système API 20NE	Isolat de		Pourcentage des espèces dans les deux eaux
	Vauban (%)	Source du Clos de l'Abbaye (%)	
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	20,0	10	16,4
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	20,0	5	14,5
<i>Burkholderia cepacia</i>	8,6	30	16,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,7	5	5,5
<i>Pseudomonas putida</i>	-	5	1,8
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	5	1,8
<i>Comamonas testosteronii</i>			
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2,9	5	3,6
<i>Aeromonas salmonicida</i>	2,9	-	1,8
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	8,6	-	5,5
<i>Pasteurella haemolytica</i>	-	10	3,6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8,6	5	7,3
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,9	-	1,8
<i>Wecksella virosa</i>	2,9	-	1,8
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	2,9	5	3,6
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	5,7	-	3,6
<i>Chryseomonas luteola</i>	5,7	5	5,5
<i>Sphingomonas multivorum</i>	2,9	-	1,8
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	10	3,6
Total des souches	35	20	55
Total des phénons	13	13	18

N.B : L'identification d'espèces bactériennes cliniques rencontrées dans les échantillons reste sujette à caution compte tenu des difficultés d'identification des micro-organismes de l'environnement par de simples tests biochimiques.

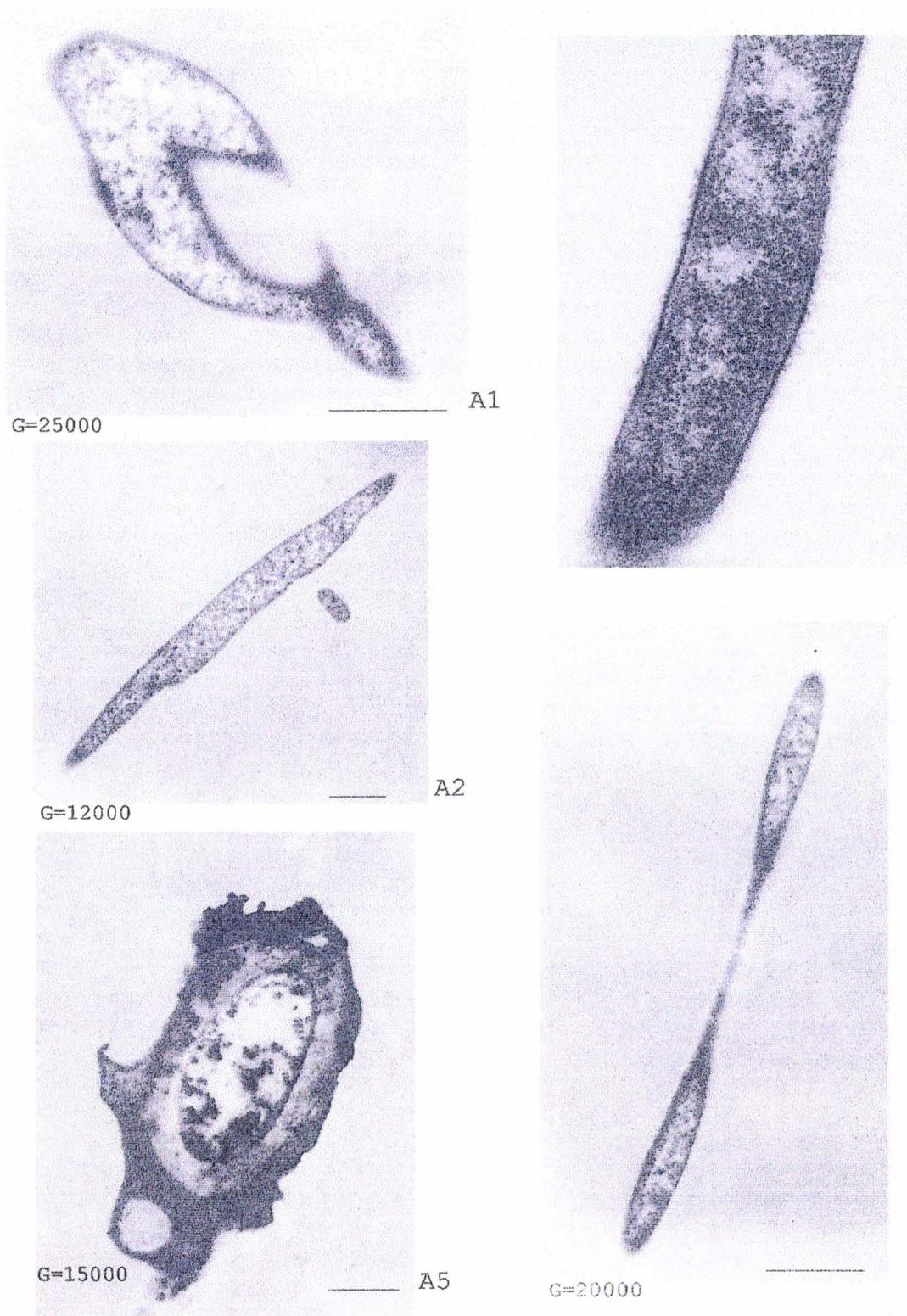


Photo 23 : Observation au microscope électronique de la microflore de l'eau du griffon Vauban.

évidence autant de cellules viables que possible, nous utilisons des techniques de culture en surface, de longues périodes d'incubation (3 jours à 2 semaines), un milieu pauvre en nutriment (R2A) recommandé pour le dénombrement des bactéries hétérotrophes cultivables des eaux de boisson (Morais et Da Costa 1990) et des filtres de porosité 0,2 µm en acétate de cellulose ou en polycarbonate (à la place des membranes de porosité 0,45µm recommandées dans les méthodes officielles).

Dans les études écologiques sur les eaux, les températures d'incubation influencent les dénombrements bactériens (Bischofberger *et al.* 1990). Les basses températures (similaires aux conditions environnementales) apparaissent plus efficaces pour retrouver une population bactérienne maximale. Ainsi, nous choisissons d'utiliser les températures propres aux eaux de forage c'est-à-dire 26°C pour Vauban et 18°C pour la Source du clos de l'Abbaye afin d'écartier un facteur de stress et de permettre une plus rapide adaptation aux conditions de laboratoire.

Les eaux minérales non carbonatées de la Source Vauban donnent des numérations de cellules cultivables comparables à celles rapportées dans d'autres études (Buttiaux et Boudier 1960; Ducluzeau *et al.* 1976). Au contraire, les dénombrements de la population bactérienne de la Source du Clos de l'Abbaye donnent des résultats excessivement bas, comparés aux données publiées. Cette source apparaît donc comme originale de part sa population bactérienne cultivable.

Les faibles nombres des bactéries hétérotrophes dans les eaux minérales à l'émergence sont considérées comme le résultat des conditions naturelles de l'environnement telles que le jeûne nutritif et les caractéristiques physiques de l'eau.

Au cours de la période Janvier 1996 et Juin 1997, la composition de la microflore de la Source Vauban est relativement stable alors que nous observons des changements significatifs dans le nombre de bactéries viables et cultivables des échantillons d'eau de la Source du Clos de l'Abbaye. Ces données sont en désaccord avec la stabilité de la microflore des eaux à l'émergence définie par Ducluzeau *et al.* (1976).

L'eau profonde de la Source du Clos de l'Abbaye possède des radio éléments indiquant un temps de séjour de l'eau de plus de 5000 ans (Chery 1992). Comparée à l'eau de la Source Vauban cette caractéristique expliquerait les particularités de la population bactérienne "stressée" de la Source du Clos de l'Abbaye: une population bactérienne cultivable, faible et variable, un taux de croissance bas, une large proportion d'ultramicrobactéries et une identification particulièrement difficile avec le système API 20NE. D'autres facteurs tels que

la profondeur, la géologie de l'aquifère et la température pourraient également participer à ces différences.

Habituellement les micro-organismes dominants dans les eaux minérales sont des bâtonnets à Gram négatif. Dans notre étude aucune bactérie à Gram positif n'est isolée. Les caractéristiques géologiques peuvent jouer un rôle dans le phénomène de sorption bactérienne et pourquoi pas dans la sélection d'un type de micro-organisme.

Malheureusement, nous manquons d'informations géologiques pour discuter ces résultats.

La plupart des micro-organismes que nous isolons, le sont également dans d'autres études portant sur les eaux minérales à leur source ou embouteillées (Quevedo-Sarmiento *et al.* 1986; Oger *et al.* 1987; Morais et Da Costa 1990).

Le nombre des différentes espèces bactériennes que nous rencontrons à partir des deux sources se trouvent dans la gamme (1 à 20 espèces) rapportées pour différentes eaux minérales (Manaia *et al.* 1990; Ferreira *et al.* 1996). Les espèces *Sphingomonas paucimobilis*, *P. putida* et *Brevundimonas vesicularis* sont fréquemment reportées dans d'autres études portant sur les bactéries aquatiques et les eaux minérales (Morais et Da Costa 1990; Amy *et al.* 1992; Leclerc 1994; Brown et Leff 1996; Ferreira *et al.* 1996). Les espèces *S. paucimobilis* ainsi que *B. vesicularis* sont les seules espèces communes aux eaux minérales françaises (Guillot et Leclerc 1993). L'espèce *Chryseobacterium meningosepticum* (anciennement *Flavobacterium*) est parfois isolée des environnements aquatiques (Manaia *et al.* 1990; Leclerc 1994; Zheng et Kellogg 1994), bien qu'elle soit le plus souvent rencontrée en milieu médical.

Les souches identifiées *Pseudomonas* sp. et les germes apparentés apparaissent vraisemblablement universelles (Allemagne, Portugal, France, Liban, Espagne et les Etats-Unis) dans les eaux minérales (Mosso Romeo *et al.* 1981; Quevedo-Sarmiento *et al.* 1986; Hunter 1993).

Selon Schwaller et Schmidt-Lorenz (1981), et Leclerc (1994), chaque source possède une composition bactérienne spécifique. En effet les deux sources de S¹ Amand se différencient par des données bactériologiques quantitatives et qualitatives.

Certains auteurs trouvent des protozoaires (Riveira *et al.* 1981), des algues (El-Zanfaly 1990), des virus (Biziagos *et al.* 1988) ou des *P. aeruginosa* (Gonzalez *et al.* 1987; Duquino et Rosenberg 1987) dans les eaux embouteillées. Dans notre étude nous ne rencontrons pas de parasites, ni micro-algues, ni indicateurs de contamination fécale, ce qui présume de la bonne

qualité des eaux au niveau de forages protégés. Certains auteurs isolent pourtant *Pseudomonas aeruginosa* qui semble commun à de nombreuses eaux minérales (Hunter 1993 ; Richards 1992 ; Fewtrell 1997). Il est considéré comme la cause la plus fréquente de retrait de lot d'eau embouteillée, 1,2 à 10,2% des échantillons (Morais *et al.* 1997). D'autres part certaines bactéries peuvent mimer l'aspect de *P. aeruginosa*, notamment sur milieu d'isolement (milieu à l'acide nalidixique et milieu cétrimide). Ces isolats de *P. aeruginosa-like* de l'environnement sont rencontrés comme colonisant de manière persistante les sites d'embouteillage, et s'avèrent difficiles à identifier sur la base de caractères phénotypiques seulement (Kon and Corniglia, 1994).

La population bactérienne viable apparaît également faible si on la compare à celle observée par d'autres auteurs dans des eaux de boisson (Oger *et al.* 1987), bien que notre méthode de coloration semble plus efficace que celle utilisant l'activité respiratoire ou métabolique, dans cet environnement aquatique oligotrophe. Les résultats montrent également la présence de micro-organismes viables mais non cultivables (Mc Dougal *et al.* 1998).

La microscopie électronique révèle des formes bactériennes particulières dans la population des eaux minérales. Nous trouvons des structures fibrillaires formant une matrice à la surface des cellules, qui suggère la fixation des bactéries dans ces eaux profondes. En effet, l'adhésion constitue généralement une réponse des bactéries retrouvées dans des environnements oligotrophiques (Lawrence et Hendry 1996).

La déformation et l'élongation des bactéries sont également observées et peuvent être expliquées par le jeûne nutritif, qui génère souvent des défauts dans les structures pariétales. La division est aussi perturbée: allongement des bactéries, apparition de septa, absence ou retard de fragmentation des cellules mères avec parfois des traînées inhabituelles de matériels cellulaires. Ces observations confirment la présence de bactéries viables non cultivables et sont en accord avec Kondo *et al.* (1994), en ce qui concerne l'aspect morphologique de telles cellules.

Nous notons à nouveau des différences entre les deux sources. Ainsi, les profils de viabilité des populations bactériennes pourraient également servir dans la détermination de la spécificité biologique.

Les variations observées sont moins importantes que celles obtenues dans les dénombrements des cellules cultivables. Nous pensons que la communauté bactérienne modifie plutôt sa nature que son effectif total. Ainsi les conditions environnementales joueraient un rôle important sur la cultivabilité des bactéries dans nos sources. Alors que la

stabilité physique et chimique des eaux profondes sont connues, les variations observées pourraient incriminer les moyens d'extraction des eaux (forage, pompe...).

I.6/ Conclusion

Nos travaux montrent qu'il existe une spécificité biologique dans nos eaux de forage. Hormis l'absence de flore planctonique, d'indicateurs fécaux et la présence d'une population viable cultivable en faible nombre (quelques UFC/ml), nous obtenons des différences quant à la nature, la quantité, les fluctuations annuelles, la viabilité des micro-organismes aquicoles. La microflore de l'eau de la Source du Clos de l'Abbaye est par exemple moins importante que celle de la Source Vauban.

Les genres Pseudomonas sensu lato et sensu stricto constituent la population microbienne dominante des deux forages et les autres genres retrouvés sont tous associés à d'autres études sur les eaux minérales.

Nous observons également la présence de cellules viables non cultivables et d'ultramicrobactéries dans les deux eaux minérales au griffon. Leurs morphologies atypiques rapportées dans cette étude mettent l'accent sur leurs particularités physiologiques et métaboliques.

II/ Etude de la microflore des eaux minérales embouteillées des sources Vauban et Clos de l'Abbaye

Dans l'étude de la communauté bactérienne libre et adsorbée dans les bouteilles, les eaux embouteillées ne sont pas agitées. Le stockage est réalisé à température ambiante (20°C) ainsi les conditions expérimentales ressemblent aux conditions de stockage rencontrées chez le distributeur ou le consommateur.

Des études antérieures réalisées par le laboratoire montrent que la microflore des eaux évoluaient rapidement. Ainsi, la moitié des analyses est effectuée sur la première semaine.

Nous nous intéressons aux parois et aux culots des bouteilles plastiques, l'influence des propriétés de surface du PET et du PVC (résultant des process de fabrication) et la sédimentation des bactéries peuvent être alors étudiées.

II.1/ Evolution de la population bactérienne libre dans les eaux minérales embouteillées

La Figure 15 indique le nombre de cellules viables et cultivables ainsi que le nombre de cellules totales observées immédiatement après embouteillage et après stockage de 1, 2, 3, 4, 8, 13, 23 et 106 jours à 20°C.

Immédiatement après l'embouteillage, le nombre de bactéries hétérotrophes cultivables est très bas sur milieu R2A, 3 UFC/ml, mais augmente très rapidement au cours du stockage pour atteindre des niveaux maximaux au bout de 8 à 13 jours. Cette population bactérienne n'évolue de façon appréciable dans les bouteilles lors des 2,5 mois suivants. En ce qui concerne le nombre de bactéries totales, nous notons une décroissance (1 log) au cours des deux premiers jours. Ensuite, une augmentation progressive est observée jusqu'à atteindre un maximum ($1,9 \times 10^4$ bactéries ml^{-1} pour Vauban et $3,15 \times 10^4$ bactéries ml^{-1} pour Source du Clos de l'Abbaye) après 8 à 13 jours de stockage. Durant les trente semaines suivantes, la population bactérienne s'est stabilisée.

II.2/ Evolution des bactéries fixées sur les parois des bouteilles

Pour comparer les résultats entre eux, nous les convertissons en nombre de bactéries par mm^2 (Figure 16).

Nous notons les mêmes observations concernant la densité bactérienne de la surface latérale et celle de la surface totale. Dans les deux eaux embouteillées, ce nombre tout d'abord faible,

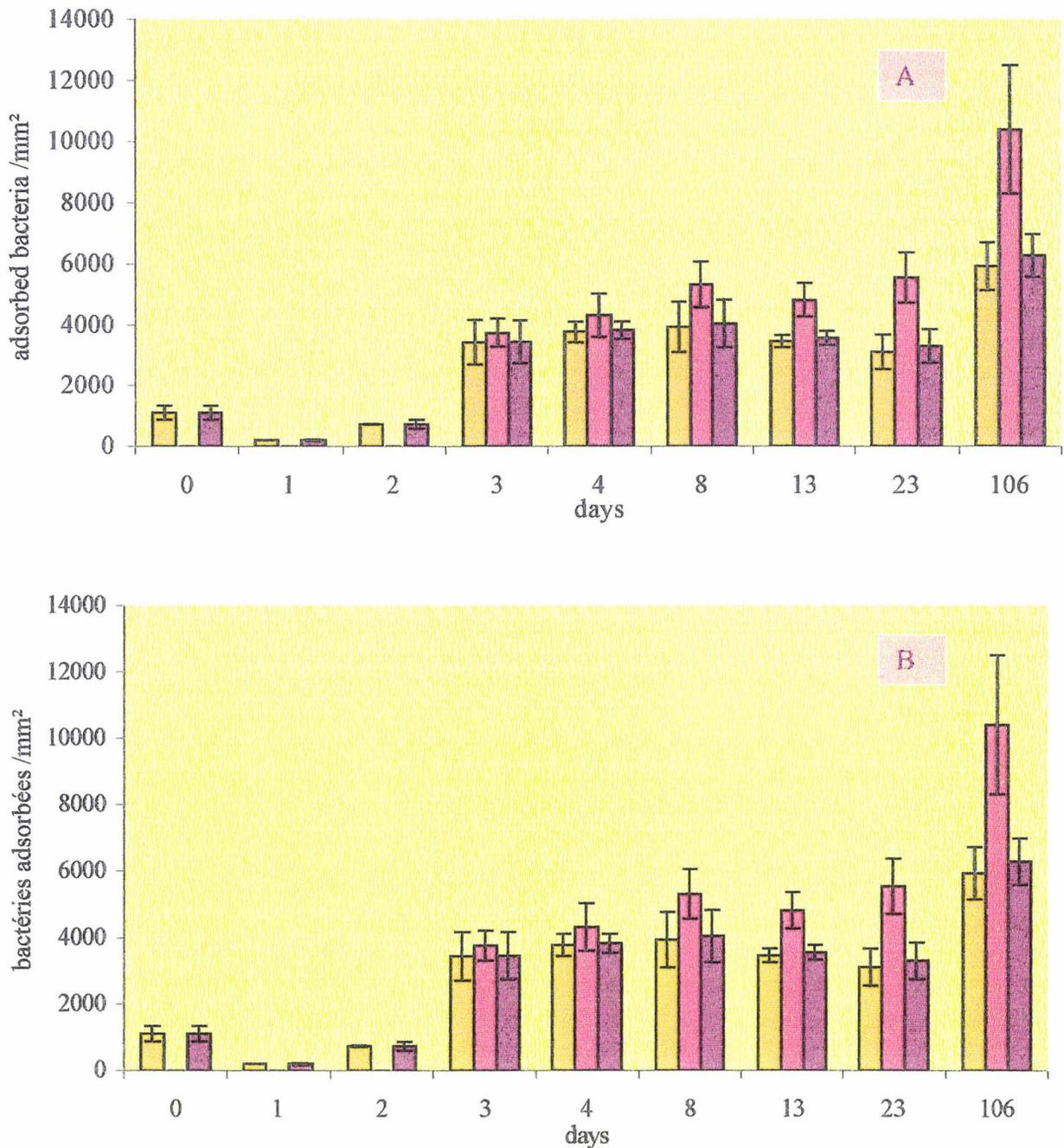


Figure 16: Evolution de la population bactérienne adsorbée sur les bouteilles plastiques de deux marques d'eau minérale (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Bactéries adsorbées sur les bouteilles de Vauban (A) et celle de la Source du Clos de l'Abbaye (B), paroi latérale ■, fond de bouteille ■ et surface totale ■.

Les barres représentent l'écart type (σ). L'expérience est effectuée sur 3 bouteilles par source, et 4 fragments de plastique par zone et par bouteille (n=12).

croît soudainement d'un facteur cinq pour Vauban ($1,84 \times 10^3$ bactéries. mm^{-2}) et de huit pour la Source du Clos de l'Abbaye ($3,44 \times 10^3$ bactéries. mm^{-2}) (surface latérale). Les dénombrements augmentent irrégulièrement pour atteindre $2,88 \times 10^3$ bactéries mm^{-2} et $6,29 \times 10^3$ bactéries mm^{-2} (surface totale) respectivement dans les bouteilles Vauban et Source du Clos de l'Abbaye, après 106 jours de stockage. La densité bactérienne sur le culot des bouteilles n'est déterminée qu'après trois jours de stockage, après quoi, elle augmente légèrement dans les bouteilles de SDCA et plus rapidement dans les bouteilles de Vauban, pour atteindre respectivement $1,04 \times 10^4$ et $5,27 \times 10^3$ bactéries mm^{-2} .

II.3/ La microflore bactérienne totale (libre et adsorbée) dans les eaux minérales embouteillées

Initialement, les populations bactériennes dans les bouteilles sont élevées (Tableau 10), $1,4 \cdot 10^8$ bactéries bouteille⁻¹ pour SDCA et $5,9 \cdot 10^7$ bactéries bouteille⁻¹ pour Vauban. Ces populations sont divisées par 2 à 3 lors des deux premiers jours de stockage, puis augmentent irrégulièrement jusqu'à la fin de l'étude pour atteindre respectivement $4,9 \cdot 10^8$ et $2,3 \cdot 10^8$ bactéries par bouteille.

II.4/ Etude de l'adsorption des bactéries sur les parois des bouteilles

Cette étude porte sur les échantillons du 23^{ème} et du 106^{ème} jours du stockage. Les résultats montrent une faible augmentation du nombre de bactéries fixées.

A partir du Tableau 11 nous déterminons différents paramètres tels que:

- (1) Le pourcentage moyen des bactéries fortement fixées (rapport entre le dénombrement bactérien sur les parois après agitation et le dénombrement des bactéries totales sur les parois).
- (2) Le pourcentage moyen des bactéries faiblement fixées (rapport entre le dénombrement bactérien total dans l'eau de rinçage et le dénombrement des bactéries totales adsorbées sur les parois).
- (3) Le pourcentage moyen des bactéries viables et cultivables dans la population faiblement fixée (rapport entre le dénombrement des bactéries hétérotrophes viables et cultivables dans l'eau de rinçage et le nombre total des bactéries dans cette eau).

Les pourcentages⁽¹⁾ issus des bouteilles de Vauban et de SDCA variaient respectivement de 90 à 67% et de 86 à 51%. Les pourcentages⁽²⁾ des bactéries faiblement fixées augmentent très

Tableau 10: Evolution de la population bactérienne totale libre et adsorbée dans les eaux minérales embouteillées (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Dénombrement	Source	Jours									
		0	1	2	3	4	8	13	23	106	
Bactérie libre $1,5\text{ l}^{-1}$	Vauban	$4,83 \times 10^7$	$1,91 \times 10^7$	$7,60 \times 10^6$	$9,57 \times 10^6$	$2,15 \times 10^7$	$2,83 \times 10^7$	$2,53 \times 10^7$	$2,47 \times 10^7$	$3,50 \times 10^7$	
	SDCA	$5,84 \times 10^7$	$6,97 \times 10^7$	$5,77 \times 10^6$	$1,14 \times 10^7$	$2,26 \times 10^7$	$3,31 \times 10^7$	$4,73 \times 10^7$	$2,87 \times 10^7$	$4,17 \times 10^7$	
Bactérie fixée / surface totale de la bouteille	Vauban	$1,10 \times 10^7$	$1,04 \times 10^7$	$1,64 \times 10^7$	$3,09 \times 10^7$	$2,72 \times 10^7$	$1,32 \times 10^8$	$8,02 \times 10^7$	$9,39 \times 10^7$	$1,98 \times 10^8$	
	SDCA	$7,86 \times 10^7$	$1,44 \times 10^7$	$5,18 \times 10^7$	$2,46 \times 10^8$	$2,72 \times 10^8$	$2,88 \times 10^8$	$2,53 \times 10^8$	$2,35 \times 10^8$	$4,47 \times 10^8$	
Bactérie totale par bouteille	Vauban	$5,93 \times 10^7$	$2,95 \times 10^7$	$2,40 \times 10^7$	$4,04 \times 10^7$	$4,87 \times 10^7$	$1,60 \times 10^8$	$1,05 \times 10^8$	$1,19 \times 10^8$	$2,33 \times 10^8$	
	SDCA	$1,37 \times 10^8$	$8,41 \times 10^7$	$5,76 \times 10^7$	$2,58 \times 10^8$	$2,95 \times 10^8$	$3,21 \times 10^8$	$3,01 \times 10^8$	$2,63 \times 10^8$	$4,89 \times 10^8$	

Tableau 11: Dénombrement et caractérisation de la communauté microbienne adsorbée sur les parois des bouteilles des deux eaux minérales commercialisées (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye).

Source	Temps de stockage (jours)	Dénombrement			
		Bactéries totales sur les parois		Bactéries totales	Bactéries viables cultivables
		Avant agitation	Après agitation	En suspension	
Vauban	23	$9,46 \times 10^7 \pm 2,60 \times 10^7^*$	$8,40 \times 10^7 \pm 6,9 \times 10^6$	$4,87 \times 10^6 \pm 1,21 \times 10^6$	$9,80 \times 10^4 \pm 3,06 \times 10^4$
	106	$1,95 \times 10^8 \pm 3,5 \times 10^7$	$1,30 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^7$	$1,95 \times 10^8 \pm 1,06 \times 10^8$	$5,70 \times 10^4$
Source du Clos de l'Abbaye	23	$2,33 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^7$	$2,03 \times 10^8 \pm 6,8 \times 10^7$	$7,47 \times 10^6 \pm 3,95 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5 \pm 2,79 \times 10^5$
	106	$4,43 \times 10^8 \pm 5,0 \times 10^7$	$2,20 \times 10^8 \pm 1,04 \times 10^8$	$3,30 \times 10^7 \pm 3,50 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5 \pm 1,71 \times 10^5$

* écart type (n=12).

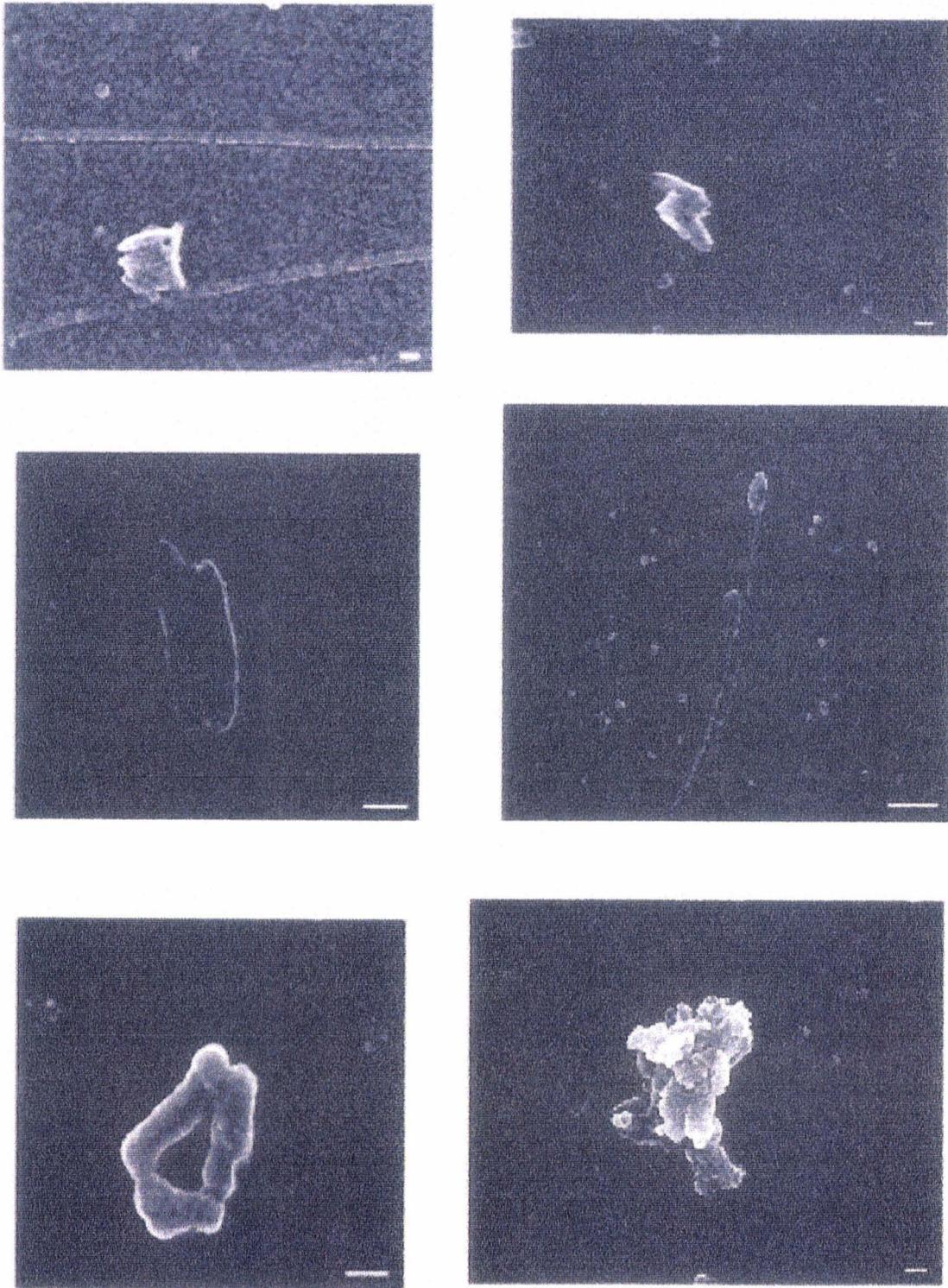


Photo 24: Planche photographique des bactéries adsorbées sur les parois des bouteilles plastiques observées en microscopie électronique à balayage. (1) et (2) ultramicrocolonies sur PVC ; (3), (5) et (6) ultramicrobactéries et ultramicrocolonies sur PET ; (4) bactéries pédonculées sur PET. La barre correspond à 0,1 μm .

légèrement pour SDCA (de 3 à 7%) et de façon appréciable pour Vauban (de 5 à 38%). Les nombres de bactéries cultivables désorbées sont très faibles, comparés aux dénombrements des bactéries totales de l'eau de rinçage. En effet, ils ⁽³⁾ représentent seulement 2 à 5% pour Vauban et SDCA, respectivement. De plus, ces pourcentages décroissent en fonction du temps pour atteindre 0,2 et 2%.

II.5/ Mise en évidence d'ultramicrobactéries et d'ultramicrocolonies sur les parois des bouteilles en PET et PVC par microscopie électronique à balayage

Cette observation s'est faite après 1 jour, 1 semaine, 1 mois et 1 an de conservation, sur les parois latérales et le fond des bouteilles en PET et PVC. Nous retenons plusieurs microphotographies rassemblées sur la planche photographique 24.

L'examen en microscopie électronique à balayage des échantillons de PET et PVC révèle l'adsorption d'ultramicrobactéries (bactéries avec 0,1 µm de diamètre et 0,3 µm de longueur) (Photos 24.3 et 24.5) la présence d'une bactérie géante pédonculée sur les parois des bouteilles en PVC des eaux de la Source du Clos de l'Abbaye (photo 24.4) et la formation d'ultramicrocolonies, mais aucun biofilm n'est observé (Photos 24.1, 24.2 et 24.6). Les résultats qualitatifs et quantitatifs sont identiques quels que soient les échantillons (parois latérales, fonds de bouteilles, bouteilles en PET et bouteilles en PVC, durée de stockage).

II.6/ Identification des souches les plus représentatives isolées des deux eaux minérales naturelles embouteillées

Soixante dix souches sont isolées des deux marques d'eau embouteillée. Toutes sont des bâtonnets à Gram négatif, non fermentatifs sur Kligler, à cytochrome oxydase positive exceptés 5 isolats. Il faut remarquer que certains isolats n'ont pu être conservés lors des subcultures.

Les résultats d'identification sont indiqués dans le Tableau 12. Les espèces *Brevundimonas vesicularis*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Ochrobactrum anthropi* sont numériquement dominantes. Comme dans les eaux à l'émergence, le groupe contenant la plus grande quantité d'isolats (51% pour Vauban et 43,5% pour SDCA) est composé d'espèces appartenant au genre *Pseudomonas sensu lato* et *sensu stricto*. Dans un premier sous-groupe, nous trouvons *Pseudomonas alcaligenes* (6%), *Ps. stutzeri* (4,5%) et *Ps. chlororaphis* (1,5%). Un autre sous-groupe est formé de *Sphingomonas paucimobilis* (13%),

Tableau 12: Identification des bactéries représentatives et isolées de deux eaux minérales embouteillées (la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye), après un examen ponctuel de tous les clones obtenus sur un échantillon dilué et ensemencé sur gélose R2A.

Identification avec le système API 20NE	Isolat		Pourcentage des espèces dans les deux eaux
	Vauban (%)	Source du Clos de l'Abbaye (%)	
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	11	12	11,3
<i>Brevundimonas diminuta</i>	4		1,4
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	11	14	12,7
<i>Burkholderia cepacia</i>		7	4,2
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	4		1,4
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7	2	4,2
<i>Ralstonia pickettii</i>		2	1,4
<i>Comamonas testosteronii</i> / <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	7	4,5	5,6
<i>CDC gr. IV C-2</i>	7	2	4,2
<i>Aeromonas salmonicida</i>	4	7	5,6
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	4	4,5	4,2
<i>Flavobacterium breve</i>		2	1,4
<i>Pasteurella sp.</i>	4	4,5	4,2
<i>Acinetobacter lwoffii/johnsonii/junii</i>	15	4,5	8,5
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	4	4,5	4,2
<i>Moraxella sp.</i>		4,5	2,8
<i>Oligella urethralis</i>	7		2,8
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		2	1,4
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	7	23	16,9
<i>Alcaligenes faecalis</i>	4		1,4
Total des souches	27	44	71
Total des phénotypes	15	16	19

N.B : L'identification d'espèces bactériennes cliniques rencontrées dans les échantillons reste sujette à caution compte tenu des difficultés d'identification des micro-organismes de l'environnement par de simples tests biochimiques.

Brevundimonas vesicularis, *Br. diminuta* (12,5%), *Burkholderia cepacia* (4%) et *Ralstonia pickettii* (1,5%). Certaines espèces sont retrouvées dans un seul type d'eau (Vauban ou SDCA) (par exemple, *Burkholderia cepacia*, *Flavobacterium breve*, *Alcaligenes faecalis*). En revanche, 58% des espèces sont rencontrées dans chacune des eaux minérales embouteillées. Ce dernier cas s'applique principalement aux phénotypes majoritaires. Nous notons un nombre similaire d'espèces dans les deux eaux minérales, 15 et 16 pour respectivement Vauban et SDCA. Il est plus important, comparé aux données bactériennes de l'émergence. Le système API 20 NE donne 44% de bonnes identifications (% id.>90%) et 57% d'identifications acceptables (% id.>80%). Ces résultats concernent principalement le groupe redéfini des *Pseudomonas* et les genres *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium* et *Oligella*.

II.7/ Discussion

Après embouteillage des eaux minérales, les conditions environnementales dans les bouteilles changent radicalement et forment un système clos. Les bactéries présentes, commencent alors à croître dans ces conditions statiques (Schmidt-Lorenz 1976). Dans nos expériences, les eaux minérales plates embouteillées non agitées donnent des dénombrements inférieurs aux études antérieures (Warburton *et al.* 1986; Gonzalez *et al.* 1987; Oger *et al.* 1987), dus probablement à la présence d'une microflore adsorbée sur les parois. Des populations élevées de bactéries hétérotrophes dans les eaux minérales plates sont considérées comme le résultat d'un processus biologique naturel résultant de la multiplication des bactéries présentes en faible nombre dans la source (Manaia *et al.* 1990) et acquises au cours de l'embouteillage.

La plupart des micro-organismes isolés sont les mêmes que ceux rencontrés dans des études antérieures. Il apparaît que le système API 20NE est efficace pour identifier ces souches au niveau de l'espèce dans le cas des *Pseudomonas sensu lato* et *sensu stricto* (60%), ce qui est également décrit par Mavidou (1992). Ce système d'identification donne des résultats pour les genres majeurs *Acinetobacter*, *Agrobacterium* et *Ochrobactrum* (70%). Cette méthode est décrite comme étant limitée pour l'identification des bactéries de l'environnement (Leclerc 1994) cependant, elle peut fournir parfois des informations intéressantes rapidement et simplement.

Des études antérieures rapportent occasionnellement des coliformes (Warburton *et al.* 1992) et *Pseudomonas aeruginosa* (Rivilla et Gonzalez 1988) en petits nombres dans les eaux

embouteillées. Nous ne trouvons pas ce type de micro-organismes dans nos échantillons, ainsi les eaux étudiées apparaissent saines pour le consommateur si nous nous référons à la réglementation.

La présence de germes considérés comme pathogènes tels que *Moraxella*, *Pasteurella*, *Chryseobacterium*, *Bordetella*, *Oligella*, *Aeromonas*, bien que déjà rapportés dans la littérature (Manaia *et al.* ; 1990 ; Leclerc 1994 ; Zheng and Kellogg 1994 ; Tsai and Yu 1997 ; Guerzoni *et al.* 1994) est peu probable et souligne les difficultés d'identification des micro-organismes de l'environnement.

Nous observons des bactéries fixées aux parois des bouteilles en nombre variable au cours du stockage. La baisse des populations juste après embouteillage est vraisemblablement due à une importante lyse de bactéries non adaptées. Wess *et al.* (1993) montrent également la capacité des micro-organismes aquatiques et communément à Gram négatif tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Ralstonia pickettii* à coloniser la surface intérieure des conduites en chlorure de polyvinyle (Anderson *et al.* 1990). Dans cette étude, les bactéries adsorbées sur les parois des bouteilles sont généralement plus abondantes que les bactéries libres. Il est possible que le matériel organique associé aux surfaces augmente la disponibilité en nutriments (LeChevallier et McFeters 1990). Par ailleurs, on sait que l'attachement des bactéries favorise la croissance (Kjelleberg et Hermansson 1984). L'adsorption bactérienne apparaît rapidement et s'avère plus élevée dans les bouteilles en PVC que dans celles en PET, mais comme dans l'étude de Bischofberger *et al.* (1990), aucun biofilm n'est visible à la surface interne des bouteilles. Cette adsorption est influencée par l'hydrophobicité de la surface, les interactions électriques bactéries-substratum, la rugosité de la surface et l'énergie de la surface (Van haeke *et al.* 1990; Mueller *et al.* 1992; Mueller 1994). De plus, l'attachement cellulaire varie avec des paramètres environnementaux tels que la température, le pH, la concentration en éléments traces, la composition et l'équilibre des nutriments essentiels ainsi que leur ratio, la force ionique du milieu et la présence ou non d'ions spécifiques tels que le calcium et le magnésium (Paul et Jeffrey 1985). Entre les deux sources, aucun paramètre apparaît discriminant pour expliquer les différents phénomènes d'adsorption. Beaucoup d'isolats sont mobiles ce qui expliquerait la rapide adsorption bactérienne, les cellules mobiles colonisant plus rapidement que les espèces non mobiles (Mueller 1996).

La différence d'adsorption entre les deux plastiques dépend de la rugosité et de l'hydrophobicité. En effet, l'examen en microscopie électronique à balayage décrit un plastique en PVC avec une structure fibrillaire, laquelle révélerait une surface moins

régulière. De plus, des études de laboratoire antérieures sur l'attachement initial des bactéries isolées du milieu marin appartenant au genre *Pseudomonas* montrent qu'elles ont une préférence pour les surfaces à faible énergie (hydrophobe). Cette hydrophobicité de chaque substratum peut être déterminée par la mesure de l'angle de contact (θ) et exprimé comme le "travail d'adhésion" (W_A). Pringle et Fletcher (1983) donnent respectivement pour les plastiques PET et PVC, un angle de contact égal à 60° et 80° , et un W_A égal à 116.0 et 85.5 mJ/m². Leurs résultats en accord avec les nôtres révèlent une adsorption bactérienne plus forte sur le plastique PVC. Comme dans l'étude de Bischofberger *et al.* (1990), aucun biofilm n'est visible à la surface interne des bouteilles.

Les microphotographies montrent de très petites bactéries et des colonies formées de 2 à 10 cellules. La bactérie géante retrouvée à partir des échantillons de la Source du Clos de l'Abbaye ressemble étroitement à des bactéries appartenant aux genres *Hyphomicrobium*, *Hyphomonas* ou *Hirschia* lesquels ne peuvent être seulement distingués par des caractères physiologiques et biochimiques. Ces genres rapportés pour la première fois dans les eaux minérales françaises sont déjà retrouvés par Gonzalez *et al.* (1986) dans des eaux minérales espagnoles. Nous notons également une très faible proportion de bactéries cultivables fixées. Torella et Morita (1981) parlent d'ultramicrobactéries incluant 3 critères retrouvés ici: (i) bactérie avec un diamètre de 0,3 μm ou plus petit, (ii) bactérie incapable de croître sur milieu solide riche en nutriment et (iii) bactérie qui n'augmente pas en taille lors de la formation d'ultramicrocolonies. De plus, Kjelleberg *et al.* (1985) démontrent que la communauté bactérienne croissant dans un milieu pauvre en nutriment (eau de mer) affiche une grande adhésion; nous constatons ce phénomène avec l'augmentation du temps de stockage dans cet autre environnement aquatique oligotrophique, qui est l'eau minérale embouteillée.

II.8/ Conclusion

Lors de ces travaux, nous constatons une modification rapide du monde microbien des eaux minérales après embouteillage. Dans le cas des bactéries cultivables, nous observons une augmentation de la population, avec un maximum de 10^4 - 10^5 UFC./ml atteint après 5-6 jours. En ce qui concerne la microflore totale, une décroissance lors des deux premiers jours est observée, due probablement à la lyse de certaines bactéries ou à l'adsorption d'une fraction des bactéries sur les parois des bouteilles. Ensuite, une nouvelle croissance progressive est notée.

Dans ces eaux minérales, aucun indicateur fécal n'est décelé ce qui témoigne d'un produit sain selon la réglementation. Les genres retrouvés dans ces eaux sont Acinetobacter, Agrobacterium, Ochrobactrum et Pseudomonas sensu lato et sensu stricto.

Nos travaux révèlent l'importance d'une étude de la microflore adsorbée des eaux minérales embouteillées. Ils montrent une population appréciable et des caractères singuliers. En effet, nous observons la présence d'ultramicrobactéries, de bactéries pédonculées assimilées aux genres Hyphomicrobium, Hyphomonas ou Hirschia. ainsi que la formation d'ultramicrocolonies sur les surfaces plastiques des bouteilles. Cette adsorption apparaît plus forte sur le PVC et s'avère sujette aux conditions oligotrophiques, au temps de stockage et aux types physiologiques des bactéries (viables cultivables, viables non cultivables...). Ils rendent également compte d'une sous estimation de la microflore des eaux minérales dans les études antérieures.

III/ Propriétés de la microflore des eaux minérales

III.1/ Variabilité de la population bactérienne des eaux embouteillées

Aucune contamination bactérienne n'est mise en évidence dans les bouteilles vides et les bouchons avant embouteillage. Cependant, des moisissures apparaissent sur quelques échantillons.

D'après des études préliminaires, le nombre d'UFC/ml est relativement faible au niveau du griffon. Il est nettement supérieur dans le produit fini (juste après embouteillage) traduisant un apport de germes au cours de cette opération. Les écarts types élevés confirment la variabilité de l'échantillonnage. De plus, la nature du milieu de culture et la durée d'incubation révèlent d'importantes différences métaboliques entre les microflores des deux eaux minérales embouteillées. Les isolats de la source Vauban apparaissent plus rapidement que ceux de la Source du Clos de l'Abbaye pour lesquels une incubation minimale de 7 jours est nécessaire pour obtenir un nombre maximal et constant d'UFC/ml.

Selon les modalités requises lors de l'ACP, nous étudions la variabilité du nombre de bactéries dans les bouteilles soit en fonction des becs (facteur spatial) (Figure 17) soit en fonction d'un bec (facteur temporel) (Figure 18). Dans le premier cas, l'eau soutirée est homogène donc contamine théoriquement les eaux embouteillées de la même façon, sans compter l'influence du bec verseur correspondant. Dans le second cas, l'eau soutirée se différencie par l'élément temporel. Chaque boucle de remplissage possède une eau renouvelée, laquelle cette fois est comparée dans les bouteilles provenant d'un même bec. En fait, nous comparons la population bactérienne entre les différentes bouteilles sur une même rotation de la soutireuse ou en fonction du temps.

Une large dispersion est observée lors de la projection des valeurs obtenues pour chaque bec sur un axe spatial. En revanche, lorsque les bouteilles sont considérées comme les variables, la projection des valeurs obtenues, pour chaque tour de soutireuse, sur l'axe temporel a révélé une dispersion limitée.

III.2/ Comparaison des caractères nutritifs et de l'identification entre les bactéries isolées des eaux minérales des forages et des bouteilles

Parmi les différents phénotypes bactériens isolés des eaux des forages et des bouteilles, 52 phénotypes, les plus représentatifs, sont sélectionnés. Toutes ces souches sont des bâtonnets à Gram négatif, non fermentatifs et présentent une oxydase positive (sauf 3 isolats). La diversité des phénotypes reste toujours restreinte (8 à 22) (Tableaux 13, 14, 15 et 16).

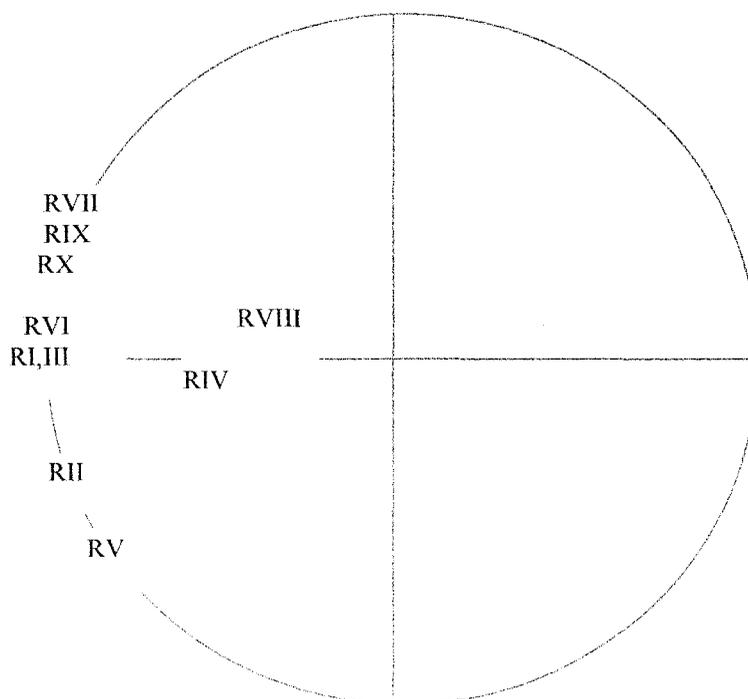


Figure 18: Cercle de corrélation établi par Analyse en Composante Principale (ACP), de la variabilité du nombre d'UFC/ml dans les bouteilles prélevées sous un même bec (B25, B30, B35, B40, B45, B50, B55, B60, B65) pour dix rotations consécutives de la soutireuse (RI à RX), soit un total de 90 bouteilles examinées

Tableau 13 : Caractéristiques et identification des bactéries isolées des eaux minérales de griffon (Source du Clos de l'Abbaye).

Souche	code NT ^a	type de croissance ^b	type nutritif ^c	vitesse de croissance ^d	identification avec le système API 20NE (id%) ^e
SF1	1.1.3	O.O.	E.	R.	nd*
SF2	1.3.3	O.	E.	R.	<i>Alcaligenes faecalis</i> (96%)
SF3	1.1.1.	O.F.	E.	R.	nd
SF4	7.-.-.	O.	Oli.	T.L.	nd
SF5	1.1.1.	O.F.	E.	R.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (99%)
SF6	1.1.1.	O.F.	E.	R.	<i>Pseudomonas putida</i> (77%)
SF7	1.1.1.	O.F.	E.	R.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (76%)
SF8	1.3.3.	O.	E.	R.	nd

^a temps d'incubation (jours) pour l'apparition d'un trouble dans les milieux PC/10.PC.BHI

^b Oligocarbotolérant Obligatoire, Oligocarbotolérant Facultatif, Oligocarboophile.

^c Eutrophe, Mesotrophe, Oligotrophe.

^d Rapide, Lent, Très Lent.

^e id% identification: très bonne (≥99%), bonne (≥90%) ou acceptable (≥80%).

* nd non déterminé

Tableau 14 : Caractéristiques et identifications des bactéries isolées des eaux minérales embouteillées (Source du Clos de l'Abbaye).

Souche	Code NT ^a	type de croissance ^b	type nutritif ^c	vitesse de croissance ^d	identification avec le système API 20NE système (id%) ^e
SB1	1.3.7	O.	M.	R.	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (97%)
SB2	3.3.3.	O.O.	E.	L.	nd*
SB3	1.3.14	O.	Oli.	R.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (78%)
SB4	1.1.3	O.O.	E.	R.	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (99%)
SB5	14.-.-	O.	Oli.	T.L.	nd
SB6	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
SB7	3.3.7	O.O.	M.	L.	nd
SB8	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
SB9	3.3.3	O.O.	E.	L.	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (94%)
SB10	3.7.7	O.	M.	L.	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (99%)
SB11	14.14	O.	Oli.	T.L.	nd
SB12	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
SB13	3.3.3	O.O.	E.	L.	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (88%)
SB14	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
SB15	3.3.3	O.O.	E.	L.	<i>Burkholderia cepacia</i> (99%)
SB16	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
SB17	1.3.-	O.	E.	R.	nd
SB18	7.7.-	O.O.	E.	T.L.	nd
SB19	1.1.1	O.F.	E.	R.	nd
SB20	3.1.1	O.F.	E.	R.	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (94%)
SB21	1.3.3	O.	E.	R.	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (97%)
SB22	7.-.-	O.	Oli.	T.L.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (84%)

^a temps d'incubation (jours) pour l'apparition d'un trouble dans les milieux PC/10.PC.BH1

^b Oligocarbotolérant Obligatoire, Oligocarbotolérant Facultatif, Oligocarbophile.

^c Eutrophe, Mesotrophe, Oligotrophe.

^d Rapide, Lent, Très Lent.

^e id% identification: très bonne (≥99%), bonne (≥90%) ou acceptable (≥80%).

* nd non déterminé

Tableau 15 : Caractéristiques et identifications des bactéries isolées des eaux minérales de griffon (Source Vauban).

Souche	Code NT ^a	type de croissance ^b	type nutritif ^c	vitesse de croissance ^d	identification avec le système API 20NE (id%) ^e
VF1	7.14.-	O.	Oli.	T.L.	nd*
VF2	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
VF3	3.7.7	O.	M.	L.	<i>Flavobacterium breve</i> (94%)
VF4	1.1.1	O.F.	E.	R.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (97%)
VF5	1.3.7	O.	M.	R.	nd
VF6	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
VF7	14.-.-	O.	Oli.	T.L.	nd
VF8	1.3.3.	O.	E.	R.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (99%)

^a temps d'incubation (jours) pour l'apparition d'un trouble dans les milieux PC/10.PC.BHI

^b Oligocarbotolérant Obligatoire, Oligocarbotolérant Facultatif, Oligocarboophile.

^c Eutrophe, Mesotrophe, Oligotrophe.

^d Rapide, Lent, Très Lent.

^e id% identification: très bonne (≥99%), bonne (≥90%) ou acceptable (≥80%).

* nd non déterminé

Tableau 16 : Caractéristiques et identifications des bactéries isolées des eaux minérales embouteillées (Source Vauban).

Souches	Code NT ^a	type de croissance ^b	type nutritif ^c	vitesse de croissance ^d	identification avec le système API 20NE (id%) ^e
VB1	1.1.1	O.F	E.	R.	nd*
VB2	1.1.3	O.O.	E.	R.	<i>Pasteurella sp.</i> (93%)
VB3	1.1.1	O.F	E.	R.	<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i> (92%)
VB4	1.1.1	O.F	E.	R.	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (49%) <i>Acinetobacter junii/johnsonii</i> (45%) <i>Acinetobacter haemolyticus</i> (3%)
VB5	3.3.3	O.O.	E.	L.	nd
VB6	1.1.1	O.F	E.	R.	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (49%) <i>Acinetobacter junii/johnsonii</i> (45%) <i>Acinetobacter haemolyticus</i> (3%)
VB7	1.1.1	O.F	E.	R.	nd
VB8	1.3.3	O.	E.	R.	nd
VB9	1.1.3	O.O.	E.	R.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (86%)
VB10	7.7.-	O.O.	M.	T.L.	nd
VB11	1.3.3	O.	E.	R.	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (92%)
VB12	7.7.7	O.O.	E.	T.L.	nd
VB13	3.3.3	O.O.	E.	L.	<i>Ochrobactrum antropi</i> (85%)
VB14	1.1.3	O.O.	E.	R.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (99%)
VB15	1.1.3	O.O.	E.	R.	<i>Oligella urethralis</i> (81%)

^a temps d'incubation (jours) pour l'apparition d'un trouble dans les milieux PC/10.PC.BHI

^b Oligocarbotolérant Obligatoire, Oligocarbotolérant Facultatif, Oligocarboophile.

^c Eutrophe, Mesotrophe, Oligotrophe.

^d Rapide, Lent, Très Lent.

^e id% identification: très bonne (≥99%), bonne (≥90%) ou acceptable (≥80%)

* nd non déterminé

Tableau 17 : Distribution de la population bactérienne de quatre types d'eaux selon leurs caractères nutritifs.

types d'eaux		% d'isolats		
		Oligocarbophile	Oligocarbotolérant Facultatif	Oligocarbotolérant Obligatoire
<i>Vauban</i>	griffon	62,5	12,5	25,0
	bouteille	14,3	28,6	57,1
<i>Source du Clos de l'Abbaye</i>	griffon	37,5	50,0	12,5
	bouteille	36,5	9,0	54,5

Tableau 18 : Répartition des types trophiques au sein des classes nutritives définies pour 52 phénotypes isolés des eaux minérales Vauban et Source du Clos de l'Abbaye.

Types nutritifs	Types de croissance	Nb. d'isolat	Total
Oligocarbotolérant Facultatif	eutrophe	9	
	mesotrophe	0	9
	oligotrophe	0	
Oligocarbotolérant Obligatoire	eutrophe	24	
	mesotrophe	2	26
	oligotrophe	0	
Oligocarbophiles	eutrophe	7	
	mesotrophe	4	18
	oligotrophe	7	
Total		53	

Certains isolats ne peuvent être identifiés en galerie API 20NE en raison de l'absence de subcultures ou de culture très lente incompatible avec le protocole API. Ces isolats représentent 19% des phénotypes isolés et sont plus fréquemment rencontrés dans les eaux embouteillées. Globalement, la galerie API 20NE ne permet d'identifier (bonne identification : id% \geq 90%) que 20 phénotypes sur les 42 testés (Tableaux 13, 14, 15 et 16). Les espèces bactériennes identifiées varient en fonction de l'origine de l'eau. Dans le cas de la source Vauban, parmi les isolats correctement identifiés, seule l'espèce *Sphingomonas paucimobilis* est rencontrée dans les eaux du griffon et embouteillées. Il faut noter l'apparition notable du genre *Acinetobacter* dans les eaux embouteillées. En ce qui concerne la Source du Clos de l'Abbaye, l'espèce *Ochrobactrum anthropi* n'est jamais isolée dans les eaux du griffon mais prédomine dans les eaux embouteillées.

III.3/ "Nutrient Tolerance"

Les résultats du NT pour chacun des phénotypes s'avèrent reproductibles. Les divers types d'exigences nutritives sont rencontrés indépendamment des sources et de l'origine des prélèvements (Tableau 17). Au niveau des eaux embouteillées et du griffon Source du Clos de l'Abbaye, la population bactérienne est majoritairement oligocarbotolérante (environ 63 %). Les variations portent seulement sur la nature de cette oligocarbotolérance: facultative (9,0 à 50,0 %) ou obligatoire (12,5 à 54,5 %). Les bactéries des eaux embouteillées sont majoritairement des oligocarbotolérants obligatoires. En ce qui concerne la microflore de Vauban, le pourcentage de bactéries oligocarbofiles diminue considérablement entre l'eau du griffon et celle des bouteilles; dans le même temps, les populations oligocarbotolérantes augmentent proportionnellement d'un facteur proche de 2. Les profils des isolats des eaux de griffon subissent donc des changements lors de l'embouteillage.

A l'exception de 2 isolats (VB9 et SB7) les souches oligocarbotolérantes obligatoires ou facultatives sont eutrophes. Parmi les isolats oligocarbofiles, les trois types nutritifs sont retrouvés en proportions pratiquement identiques (Tableau 18).

III.4/ Discussion

L'absence de contamination bactérienne au niveau des bouteilles vides et des bouchons permet d'affirmer que les éléments du conditionnement ne peuvent être impliqués dans les variations de la microflore des eaux embouteillées.

L'Analyse en Composante Principale montre que les différences quantitatives observées dans les échantillons proviennent principalement des becs, le renouvellement de l'eau de la soutireuse semble secondaire. La microflore des eaux minérales embouteillées est dominée par des micro-organismes colonisant les becs et véhiculés à leur niveau par aérobiocontamination.

Le relargage bactérien aléatoire de bio films présents au niveau des canalisations, des joints et des filtres, dans l'eau arrivant à la soutireuse peut également être incriminé mais dans une moindre mesure. En effet, les résultats bactériologiques de l'eau du griffon (indemne de contamination propre à la chaîne d'embouteillage, car en amont) donnent une population toujours très faible (quelques UFC/ml). L'origine de ces bio films reste à déterminer. Ils sont cependant largement retrouvés dans des conduites d'eaux potables (Van Haecke *et al.* 1990; Kalmbach *et al.* 1997) de diverses natures telles que PVC, verre, inox,... (Wess *et al.* 1993). Ces résultats ne confirment pas l'idée généralement reçue que la population des eaux embouteillées dérive de la multiplication de la microflore rencontrée en faible nombre dans les forages et que l'apport de germes en provenance de la chaîne d'embouteillage semble secondaire (Manaia *et al.* 1990).

A notre connaissance, ce type d'étude n'a jamais été réalisée. L'analyse en Composante Principale nous permet de rendre compte de la variabilité des échantillons mais également de cibler l'origine de ces variations

Approximativement, 50% des isolats sont identifiés par galerie API 20NE. Ce système d'identification est très utilisé cependant le pourcentage des isolats aquicoles identifiés avec un niveau élevé de probabilité ne dépasse pas généralement 20 à 30% (Amy *et al.* 1992; Leclerc 1994; Zheng et Kellogg 1994; Ferreira *et al.* 1996).

Le nombre d'espèces bactériennes isolées dans les différents échantillons étudiés est du même ordre de grandeur (1 à 20 espèces par marque) que ceux rapportés pour différentes marques d'eaux minérales (Manaia *et al.* 1990; Ferreira *et al.* 1996). Les espèces *Sphingomonas paucimobilis* et *Brevundimonas vesicularis* sont fréquemment rapportées dans d'autres études sur les bactéries aquatiques et les eaux minérales (Morais et Da Costa 1990; Amy *et al.* 1992; Leclerc 1994; Brown et Leff 1996, Ferreira *et al.* 1996). Les espèces *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Brevundimonas vesicularis* sont les seules espèces communes aux marques d'eaux minérales françaises (Guillot et Leclerc, 1993) et sont également retrouvées dans notre étude. L'espèce *Chryseobacterium meningosepticum* (anciennement *Flavobacterium*) est parfois isolée d'environnements aquatiques (Manaia *et*

al., 1990; Leclerc, 1994; Zheng et Kellogg, 1994; Tsai et Yu 1997). Par contre, les espèces *Ochrobactrum anthropi* et *Oligella urethralis* n'ont jamais été rapportées dans les eaux minérales et sont généralement considérées comme des germes commensaux de l'Homme (retrouvés dans les prélèvements d'origine clinique) dont le pouvoir pathogène est mal documenté mais probablement très faible (Holt *et al.* 1994). Des bactéries appartenant au genre *Pasteurella*, rencontré une fois au cours de notre étude, est également très rarement rencontré dans les eaux minérales (Zheng et Kellogg 1994; Tsai et Yu 1997).

Le fait que des genres et (ou) espèces apparaissent dans le produit fini confirme l'apport exogène de micro-organismes, suite à des incidents technologiques ou de manière constitutive car ils colonisent le site d'embouteillage. Les genres *Ochrobactrum* (Source du Clos de l'Abbaye) et *Acinetobacter* (Vauban) appartiennent probablement à cette deuxième catégorie et constituent la microflore dominante. D'autres espèces disparaissent; dans ce cas, les processus d'embouteillage et la nouvelle niche microbienne induisent soit leur mort ou leur perte de cultivabilité ou une importante « dilution biologique » comme discuté par Morais et Da Costa (1990) et Ferreira *et al.* (1996).

Les résultats obtenus rendent crédible le "Nutrient Tolerance" comme caractère supplémentaire de caractérisation suggéré par Schmidt-Lorenz *et al.* (1990) et Mavridou (1992). Il apparaît non discriminant dans la caractérisation des espèces d'*Acinetobacter* mais montre tout son intérêt avec *Ochrobactrum anthropi*, pour laquelle un grand nombre de profils NT (4) est enregistré. Cependant, il rend compte d'une adaptation particulière des bactéries dans leur environnement aquatique. Les exigences nutritives des bactéries diffèrent entre le forage et les bouteilles mais également selon la source. Nous montrons une nouvelle fois l'importance des caractéristiques physico-chimiques de l'eau (oxygénation, apport nutritif,...) vis-à-vis du métabolisme de la microflore comme le suggèrent Warburton *et al.* (1992).

La détermination des différentes proportions des types trophiques pourrait être retenu comme critère de caractérisation d'une source donnée au même titre que les caractères physico-chimiques annexés dans les directives Européennes (Anon. 1980) et répertoriés dans le classique bulletin analytique. Les profils obtenus pour nos deux sources s'avèrent différents de ceux rapportés dans la littérature. Une étude de plus grande envergure permettrait de confirmer la valeur discriminatoire de ce Nutrient Test. Ces profils seraient des indicateurs permettant de contrôler l'évolution des caractéristiques de l'eau: apport organique, apport minérale, variation thermique...

Les disparités dans les types de croissance de la microflore embouteillée entre les deux sources corroborent les différences observées lors de la croissance de ces microflores sur milieux gélosés (R2A, PCA et PCA/10). La microflore des bouteilles Vauban apparaît beaucoup plus rapidement que celle de la Source du Clos de l'Abbaye. Elle semble donc mieux adaptée aux conditions de croissance sur milieu riche.

Selon Mavridou (1992), les souches dites autochtones peuvent être définies théoriquement comme oligocarbofiles et les souches allochtones, plutôt comme oligocarbotolérantes. La microflore rencontrée par conséquent au niveau des forages, devrait être oligocarbofile. Celle rencontrée dans les bouteilles, rendant compte d'un apport bactériologique endémique, serait alors oligocarbotolérante. Certains auteurs (Schwaller et Schmidt-Lorenz 1990; Mavridou 1992) identifient ainsi l'origine des souches isolées d'eaux minérales à partir de leurs exigences nutritives. Nous ne rencontrons pas exclusivement des souches oligocarbofiles au niveau des griffons. Nous observons de grandes proportions de souches oligocarbotolérantes notamment pour la Source du Clos de l'Abbaye. Ces micro-organismes peuvent être considérés comme des contaminants du forage, bien qu'un maximum de précautions soient prises. Une telle implantation n'est pas improbable compte tenu d'une croissance bactérienne possible dans les eaux à des concentrations en carbone organique assimilable de l'ordre de 50 µg/l (LeChevallier *et al.* 1991) et des températures comprises entre 8 et 25°C (Barillier et Garnier 1993).

Dans les bouteilles, la microflore est principalement oligocarbotolérante. Il est difficile de connaître l'origine de cette microflore. Elle peut provenir, soit de souches propres au forage, soit de souches allochtones adaptées à la chaîne d'embouteillage (filtrations, bio films...) ou contaminantes en provenance de l'environnement (air, personnel...). Il existe également de possibles contaminations par des souches oligocarbofiles. Ces dernières doivent se trouver abondamment dans l'environnement des sites d'embouteillage des eaux de consommation. En l'absence d'une parfaite connaissance de la qualité microbiologique des installations en tous points de la chaîne de production et ce depuis l'ouverture du site, ce test ne permet pas de conclure sur l'origine des souches.

III.5/ Conclusion

Malgré une définition officielle des textes Européens qui relatent de la «pureté originelle» des eaux minérales (microflore essentiellement propre au forage), les bactéries constituant la microflore des eaux embouteillées sont d'origines diverses. La population apparaît comme autochtone (propre au forage), mais surtout allochtone (exogène) endémique

Peut-être que rien n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela. 132

Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

(propre au site d'embouteillage) et accidentellement contaminante, avec un apport à plusieurs niveaux. Les caractères physico-chimiques du milieu limitent toutefois la diversité des genres, en effet la microflore rencontrée se compose essentiellement de bactéries aquicoles déjà rapportées dans la littérature.

La nature trophique des bactéries pourrait alors servir de bio-marqueur dans le suivi de la qualité au niveau de la nappe et de l'embouteillage. L'établissement d'une fiche d'identité des eaux fondée sur les profils distincts des exigences nutritives bactériennes apparaît envisageable.

IV/ Considérations taxinomiques et écologiques de la population bactérienne des eaux minérales naturelles

IV.1/ Classification

IV.1.1/ Considérations taxinomiques

La classification repose sur l'analyse numérique relative aux 43 caractères biochimiques étudiés sur BBL crystal et API 20NE). Les caractères de la galerie BIOLOG GN donnent de nombreux tests négatifs. Les taxinomistes se réfèrent principalement aux similitudes positives. L'indice de Jackard est donc utilisé et une classification hiérarchique ascendante selon la distance moyenne est établie.

Les souches étudiées sont regroupées dans 9 groupes (I à IX) (Tableau 19). Onze isolats appartenant au sous-groupe IVb2a sont assimilés à l'espèce *Sphingomonas paucimobilis*. Ces isolats sont principalement issus des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye (70%).

L'isolat du sous-groupe Vc1 provenant du griffon Vauban et celui du groupe VI provenant du griffon source du Clos de l'Abbaye sont assimilés à l'espèce *Chryseomonas luteola* et *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, respectivement. Le groupe IX regroupe quatre isolats des eaux embouteillées Vauban, soit 23,5% de cette population. Ils sont assimilés à l'espèce *Alcaligenes faecalis subsp faecalis*.

Vingt pour cent des souches restent isolées dans cette classification et 69% des isolats des eaux minérales ne sont assimilées à aucune des 42 souches type testées qui sont choisies en fonction de leur fréquence d'isolement rapportée dans la littérature sur les microflores des eaux minérales.

IV.1.2/ Considérations écologiques

Sur la base de 123 caractères biochimiques retenus et analysés avec les test du χ^2 , nous avons réalisé une autre classification hiérarchique ascendante. Tous les tests sont utilisés dans cette étude malgré des caractères négatifs abondants chez certaines espèces non pas dans un objectif de taxonomie mais dans le but d'analyser les isolats en fonction de leur niche écologique.

Seuls cinq groupes émanent de cette nouvelle classification (Tableau 20). Les deux premiers regroupent une très grande majorité des souches type testées (93%). Dans ces groupes, nous

Tableau 19 : Liste de la classification basée sur 43 caractères biochimiques de souches isolées de deux eaux minérales à l'émergence et embouteillées (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Groupe	Sous-groupe	Sous-sousgroupe	Culture de collection ou autre référence	Nommée comme	Origine			
I			ATCC 17909 ^T	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Duodénum			
			S11F		Griffon SDCA ^b			
II			S14F		Griffon SDCA			
			S17F					
III	IIIa		V25F		Griffon Vauban			
			SB5		Bouteille SDCA			
			VB2		Bouteille Vauban			
			VB3		Bouteille Vauban			
	Non classé			S15F		Griffon SDCA		
				SB23		Bouteille SDCA		
IV	IVa		CIP 60.57 ^T	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Fluide spinal de nouveau-né			
			CIP 101026 ^T			<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Trachée	
			NCTC 11099 ^T	<i>Flavobacterium breve</i>	Sécrétion bronchique humaine			
			Non classé			V28F		Griffon Vauban
						ATCC 11426 ^T		<i>Brevundimonas vesicularis</i>
			IVb	IVb1		V1F		Epithélium de sangsue
	V4F	Griffon Vauban						
	V15F	Griffon Vauban						
	V2F	Griffon Vauban						
	V14F	Griffon Vauban						
	V20F	Griffon Vauban						
	V19F	Griffon Vauban						
	V9F	Griffon Vauban						
S7F	Griffon SDCA							
S9F	Griffon SDCA							
S18F	Griffon SDCA							
SB1	Bouteille SDCA							
VB1	Bouteille Vauban							

Suite

	IVb2a	ATCC 29837 ^T	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Respirateur hospitalier	
		V23F		Griffon Vauban	
		V16F		Griffon Vauban	
		V21F		Griffon Vauban	
		VB6		Bouteille Vauban	
		SB6		Bouteille SDCA	
		SB16		Bouteille SDCA	
		SB22		Bouteille SDCA	
		SB14		Bouteille SDCA	
		SB10		Bouteille SDCA	
		SB11		Bouteille SDCA	
		SB8		Bouteille SDCA	
	IVb2b	VB5		Bouteille Vauban	
		VB13		Bouteille Vauban	
		V8F		Griffon Vauban	
		V7F		Griffon Vauban	
		V13F		Griffon Vauban	
		V30F		Griffon Vauban	
	IVb3	SB7		Bouteille SDCA	
		SB9		Bouteille SDCA	
		SB13		Bouteille SDCA	
		SB21		Bouteille SDCA	
V	Va	CIP 103303 ^T	<i>Acidovorax delafieldii</i>	Sol	
		SB17		Bouteille SDCA	
		VB12		Bouteille Vauban	
		ATCC 15668 ^T	<i>Comamonas acidovorans</i>	Sol	
	Vb	V26F		Griffon Vauban	
		V27F		Griffon Vauban	
	Vc	Vc1	V3F	Griffon Vauban	
			CIP 102995 ^T	<i>Chryseomonas luteola</i>	Plaie
	Vc2a	V17F		Griffon Vauban	
		S19F		Griffon SDCA	
		S10F		Griffon SDCA	
		S5F		Griffon SDCA	
		S8F		Griffon SDCA	
		S12F		Griffon SDCA	
		S1F		Griffon SDCA	
		S2F		Griffon SDCA	
	Vc2b	ATCC 25416 ^T	<i>Burkholderia cepacia</i>	Oignon	
		ATCC 27511 ^T	<i>Ralstonia pickettii</i>	Trachéotom Suite	
		V5F		Griffon Vauban	
		S3F		Griffon SDCA	
		ATCC 13637 ^T	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Région oropharyngique	

	Non classé	SB4 V32F	Bouteille SDCA Griffon Vauban
VI		VB4 ATCC 17440 ^T S4F	Bouteille Vauban <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> Conduits des sinus Griffon SDCA
VII		V29F CIP 82.115 ^T CIP 103116 ^T S16F CIP 104883 ^T ATCC 17484 ^T ATCC 25411 ^T ATCC 17588 ^T CIP 105274 ^T S13F V11F V12F CIP 105470 ^T ATCC 10145 ^T CIP 105469 ^T DSM 50083 ^T CIP 105273 ^T	<i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Oligella urethralis</i> <i>Pseudomonas monteilii</i> <i>Pseudomonas putida biovar B</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas jessenii</i> <i>Pseudomonas orientalis</i> <i>Pseudomonas cedrella</i> <i>Pseudomonas marginalis</i> <i>Pseudomonas aureofaciens</i> <i>Pseudomonas libaniensis</i> <i>Pseudomonas migulae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas gessardii</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Pseudomonas mandelii</i> Griffon Vauban Griffon SDCA Oreille Griffon SDCA Sol Sol Fluide spinal Griffon libanais Griffon libanais Endive Arige le la rivière Maas Griffon SDCA Griffon Vauban Griffon libanais Griffon Vauban Contaminant de boîte de Pétri
VIII		VB7 ATCC 27061 ^T ATCC 11996 ^T ATCC 14909 ^T SB20 ATCC 11568 ^T ATCC 4651 ^T	Bouteille Vauban Dépôt auriculaire <i>Alcaligenes xyloxidans subsp xyloxidans</i> <i>Comamonas testosteronii</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i> Bouteille SDCA <i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Myroides odoratus</i>
IX		VB9 VB10 VB14 VB15 ATCC 8750 ^T	Bouteille Vauban Bouteille Vauban Bouteille Vauban Bouteille Vauban <i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis</i>

Non classé	VB2		Bouteille Vauban
	VB16		Bouteille Vauban
	VB11		Bouteille Vauban Suite
	VB17		Bouteille Vauban
	SB19		Bouteille SDCA
	SB2		Bouteille SDCA
	SB3		Bouteille SDCA
	SB12		Bouteille SDCA
	SB8		Bouteille SDCA
	ATCC 17908 ^T	<i>Acinetobacter junii</i>	Urine
	ATCC 17922 ^T	<i>Acinetobacter genospecies 3</i>	
	V18F		Griffon Vauban
	V23F		Griffon Vauban
	V10F		Griffon Vauban
	V22F		Griffon Vauban
	V6F		Griffon Vauban
	V31F		Griffon Vauban
	V33F		Griffon Vauban
	S5F		Griffon SDCA
	ATCC 17924 ^T	<i>Acinetobacter genospecies 10</i>	
ATCC 23055 ^T	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		
CIP 102557 ^T	<i>Psychrobacter immobilis</i>	Volaille	
ATCC 15309 ^T	<i>Acinetobacter Lwoffii</i>		

rencontrons également des isolats issus principalement des forages (32/39), soit respectivement 79% et 52% des isolats des griffons de la Source du Clos de l'Abbaye et de Vauban. Les groupes III, IV et V représentent 54% des isolats des eaux minérales (griffon et eaux embouteillées dans deux sources).

Dans le sous groupe IVb se trouvent uniquement des isolats des eaux embouteillées Vauban. Dans le groupe V et le sous groupe IIIa1, nous retrouvons des isolats issus seulement des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye.

Les sous groupes IIIa2 et IVa2 sont hétérogènes sur l'origine des souches, en revanche le sous groupe IIIb est caractérisé par une prédominance d'isolats d'eaux embouteillées (89%).

Certaines souches sont agrégés de la même façon dans les deux classifications (43 et 123 caractères) biochimiques (exemples: IX et Ib pour Vauban bouteille, IVb3 et IIIa1 pour SDCA bouteille et Vc2a et IIc pour forage SDCA) (Tableau 20). Nous observons aussi un nombre limité de groupes et sous groupes (4 à 5 groupes et 7 à 8 sous groupes) quelles que soient les classifications.

IV.1.2.1/ Comparaison des populations de Vauban entre le forage et les bouteilles (Tableaux 21 et 22)

De nombreux isolats (64% pour le griffon et 65% pour les bouteilles) sont retrouvés dans des groupes communs. Nous notons que les isolats des groupes Ib et IIa , importants sur un plan quantitatif, sont spécifiques des eaux embouteillées et des eaux du forage Vauban, respectivement. D'autres isolats s'agrègent dans les mêmes groupes (4) quelle que soit l'origine de l'eau (griffon ou eau embouteillée).

IV.1.2.2/ Comparaison des populations de la Source du Clos de l'Abbaye entre forage et bouteille (Tableaux 21 et 22)

Soixante sept pour cent des isolats du griffon s'agrègent dans des groupes non représentés dans la population des eaux embouteillées, y compris la population dominante. De la même façon, un grand nombre d'isolats des eaux embouteillées (11/22) ne s'agrègent pas avec les isolats du forage.

Table 20 : Liste de classification basée sur 123 caractères biochimiques de souches isolées de deux eaux minérales à l'émergence et embouteillées (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Groupe	Sous groupe	Sous-sous groupe	Sous-sous-sousgroupe	Culture de collection ou autre référence ^a	Nommée comme	Origine
I	Ia	Ia1	Ia11	ATCC 23055 ^T	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
				ATCC 11996 ^T	<i>Comamonas testoteronii</i>	Sol
				ATCC 27061 ^T	<i>Alcaligenes xyloxdans subsp xyloxdans</i>	Dépôt auriculaire
				ATCC 17922 ^T	<i>Acinetobacter genospecies 3</i>	
				ATCC 17588 ^T	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Fluide spinal
				ATCC 17924 ^T	<i>Acinetobacter genospecies 10</i>	
		Ia2	Ia12	ATCC 14909 ^T	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Piscine
				ATCC 25411 ^T	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Sol
				ATCC 27511 ^T	<i>Ralstonia picketii</i>	Trachéotomie
				ATCC 17440 ^T	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Conduits de sinus
				S14F		Griffon SDCA
	V18F				Griffon Vauban	
	Ia2		ATCC 25416 ^T	<i>Burkholderia cepacia</i>	Oignon	
			CCEB 518 ^T	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Argile de la rivière Maas	
			DSM 50083 ^T	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Contaminant	
			CIP 105274 ^T	<i>Pseudomonas jessenii</i>		
			CIP 105470 ^T	<i>Pseudomonas migulae</i>		
			CIP 104883 ^T	<i>Pseudomonas monteilii</i>		
			ATCC 17484 ^T	<i>Pseudomonas putida biovar B</i>	Sol	
			S6F		Griffon SDCA	
			CIP 102995 ^T	<i>Chryseomonas luteola</i>	Plaie	
			CIP 105469 ^T	<i>Pseudomonas mandelii</i>		
V12F				Griffon Vauban		
S16F				Griffon SDCA		
S13F		Griffon SDCA				
V11F		Griffon Vauban				
ATCC 10145 ^T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
CIP 105469 ^T	<i>Pseudomonas gessardii</i>					
	<i>Pseudomonas libaniensis</i>	Griffon libanais				
	<i>Pseudomonas orientalis</i>	Griffon libanais				
	<i>Pseudomonas cedrella</i>	Griffon libanais				
Non classé		V33F		Griffon Vauban		

Suite

	lb	ATCC 8750 ^T	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp <i>faecalis</i>	
		ATCC 17908 ^T	<i>Acinetobacter junii</i>	Urine
		VB14		Bouteille Vauban
		VB9		Bouteille Vauban
		VB15		Bouteille Vauban
		VB10		Bouteille Vauban
		ATCC 11568 ^T	<i>Brevundimonas diminuta</i>	
		ATCC 11426 ^T	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Vessie
		VB7		Bouteille Vauban
		S11F		Griffon SDCA
II	IIa	ATCC 17909 ^T	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Duodenum
		CIP 82.115 ^T	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
		CIP 103116 ^T	<i>Oligella urethralis</i>	Oreille
		ATCC 15668 ^T	<i>Comamonas acidovorans</i>	Sol
		V27F		Griffon Vauban
		V24F		Griffon Vauban
		V31F		Griffon Vauban
		V25F		Griffon Vauban
		V26F		Griffon Vauban
		V30F		Griffon Vauban
	IIb	VB8		Bouteille Vauban
		V28F		Griffon Vauban
		V15F		Griffon Vauban
		S3F		Griffon SDCA
		ATCC 13637 ^T	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Région Oropharyngique
		V5F		Griffon Vauban
		SB6		Bouteille SDCA
		ATCC 29837 ^T	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Respirateur hospitalier
		CIP 101026 ^T	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Fluide spinal de nouveau né
		ATCC 4651 ^T	<i>Myroides odoratus</i>	
		V9F		Griffon Vauban
		V14F		Griffon Vauban
		V20F		Griffon Vauban
		S18F		Griffon SDCA
		NCTC 11099 ^T	<i>Flavobacterium breve</i>	Sécrétion bronchique humaine
		S14F		Griffon SDCA
		CIP 102557 ^T	<i>Psychrobacter immobilis</i>	Volaille
		V17F		Griffon Vauban
	IIc	S10F		Griffon SDCA
		S12F		Griffon SDCA

			S8F		Griffon SDCA
			S2F		Griffon SDCA
			S5F		Griffon SDCA
			S19F		Griffon SDCA
			S1F		Griffon SDCA
III	IIIa	IIIa1	SB21		Bouteille SDCA
			SB7		Bouteille SDCA
			SB9		Bouteille SDCA
		IIIa2	VB5		Bouteille Vauban
			V2F		Griffon Vauban
			SB13		Bouteille SDCA
			SB20		Bouteille SDCA
			V8F		Griffon Vauban
			SB22		Bouteille SDCA
			V7F		Griffon Vauban
			V1F		Griffon Vauban
			S9F		Griffon SDCA
			V21F		Griffon Vauban
			V16F		Griffon Vauban
			V23F		Griffon Vauban
	IIIb		VB6		Bouteille Vauban
			SB10		Bouteille SDCA
			SB8		Bouteille SDCA
			SB11		Bouteille SDCA
			SB5		Bouteille SDCA
			V19F		Griffon Vauban
			VB1		Bouteille Vauban
			SB1		Bouteille SDCA
			SB16		Bouteille SDCA
IV	IVa	IVa1	CIP 103303 ¹	<i>Acidovorax delafieldii</i>	Sol
			V3F		Griffon Vauban
			SB17		Bouteille SDCA
			VB12		Bouteille Vauban
			V32F		Griffon Vauban
			SB19		Bouteille SDCA
			VB16		Bouteille Vauban

Suite

IVa2	V22F	Griffon Vauban	
	SB14	Bouteille SDCA	
	SB4	Bouteille SDCA	
	S15F	Griffon SDCA	
	SB23	Bouteille SDCA	
	VB2	Bouteille Vauban	
	VB3	Bouteille Vauban	
	VB4	Bouteille Vauban	
	CIP 101026 ^T	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Trachée
	S7F	Griffon SDCA	
	V4F	Griffon Vauban	
	V29F	Griffon Vauban	
	V13F	Griffon Vauban	
	VB13	Bouteille Vauban	
IVb	VB17	Bouteille Vauban	
	VB11	Bouteille Vauban	
V	SB3	Bouteille SDCA	
	SB2	Bouteille SDCA	
	S17F	Griffon SDCA	
Non classé	V6F	Griffon Vauban	
	SB18	Bouteille SDCA	
	SB12	Bouteille SDCA	
	V10F	Griffon Vauban	
	ATCC 15309 ^T	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	

^a ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, Germany; CCEB, Culture Collection of Entomogenous Bacteria, Prague, Czechoslovakia; NCTC, National Collection of Type Cultures, London, United Kingdom; CIP, Collection bactérienne de l'Institut Pasteur de Paris, France.

^b SDCA, Source du Clos de l'Abbaye

Tableau 21 : Comparaison des classifications biochimiques (souches isolées des eaux embouteillées).

Type d'eau	Classification sur 43 caractères	Classification sur 123 caractères
Bouteille Vauban	<p>III (VB2, VB3)</p> <p>IVb1 (VB1)</p> <p>IVb2b (VB5, VB13)</p> <p>Va (VB12)</p> <p>VI (VB4)</p> <p>VIII (VB7)</p> <p>IX[§] (VB9, VB10, VB14, VB15)</p> <p>Non classé (VB2, VB16, VB11, VB17)</p>	<p>Ib[§] (VB14, VB9, VB15, VB10, VB7)</p> <p>IIb (VB8)</p> <p>IIIa2 (VB5)</p> <p>IIIb (VB6, VB1)</p> <p>IVa1 (VB12, VB16)</p> <p>IVa2[§] (VB2, VB3, VB4, VB13)</p> <p>IVb (VB17, VB11)</p>
Bouteille SDCA	<p>III (SB5)</p> <p>III non classé (SB23)</p> <p>IVb1 (SB1)</p> <p>IVb2a[§] (SB16, SB22, SB14, SB10, SB11, SB8, SB6)</p> <p>IVb3 (SB7, SB9, SB13, SB21)</p> <p>Va (SB17)</p> <p>Vc non classé (SB4)</p> <p>VIII (SB20)</p> <p>Non classé (SB19, SB2, SB3, SB8)</p>	<p>IIb (SB6)</p> <p>IIIa1 (SB21, SB7, SB9)</p> <p>IIIa2 (SB13, SB20, SB22)</p> <p>IIIb[§] (SB10, SB8, SB11, SB5, SB1, SB16)</p> <p>IVa1 (SB17, SB19)</p> <p>IVa2 (SB14, SB4, SB23)</p> <p>V (SB3, SB2)</p> <p>Non classé (SB18, SB12)</p>

Groupes spécifiques du forage ou des eaux embouteillées dans une même source. [§] population dominante. Groupes dont les isolats sont spécifiques de la source (Vauban ou SDCA). Souches agrégées de la même façon dans les deux classifications, biochimique ou fondée sur les acides gras.

Tableau 22 : Comparaison des classifications biochimiques (souches isolées des forages).

Type d'eau	Classification sur 43 caractères	Classification sur 123 caractères
Forage	IIIa (25F)	Ia12 (V18F)
Vauban	IV non classé (V28F, V1F)	Ia2 (V12F, V11F)
	IVb1 [§] (V4F, V15F, V2F, V14F, V20F, V19F, V9F)	IIa [§] (V27F, V24F, V31F, V25F, V26F, V30F)
	IVb2a (V23F, V16F, V21F)	IIIb [§] (V28F, V15F, V5F, V9F, V14F, V20F, V17F)
	IVb2b (V8F, V7F, V13F, V30F)	IIIa2 [§] (V8F, V7F, V1F, V21F, V16F, V23F)
	Vb (V26F, V27F)	IIIb (V19F)
	Vc1 (V3F)	IVa1 (V3F, V32F)
	Vc2a (V17F)	IVa2 (V22F, V4F, V29F, V13F)
	Vc2b (V5F)	Non classé (V6F, V10F)
	V non classé (V32F)	
	VII (V29F, V11F, V12F)	
	Non classé (V18F, V23F, V10F, V22F, V6F, V31F, V33F)	
Forage	I (S11F)	Ia12 (S14F)
SDCA	II (S14F, S17F)	Ia2 (S16F, S13F)
	III non classé (S15F)	Ib (S11F)
	IVb1 (S7F, S9F, S18F)	IIb (S3F, S18F, S14F)
	Vc2a [§] (S19F, S10F, S5F, S8F, S12F, S1F, S2F)	IIc [§] (S10F, S12F, S8F, S2F, S5F, S19F, S1F)
	Vc2b (S3F)	IIIa2 (S9F)
	VI (S4F)	IVa2 (S15F, S7F)
	VII (S16F, S13F)	V (S17F)
	Non classé (S5F)	

Groupes spécifiques du forage ou des eaux embouteillées dans une même source. [§] population dominante. Groupes dont les isolats sont spécifiques de la source (Vauban ou SDCA). Souches agrégées de la même façon dans les deux classifications, biochimique ou fondée sur les acides gras.

IV.1.2.3/ Comparaison des populations entre les deux eaux embouteillées (Tableaux 21)

Cinq groupes sur sept sont composés d'isolats d'eaux embouteillées Vauban et SDCA. Certains s'agrègent pour constituer un groupe numériquement important (Ib) et spécifique des eaux embouteillées Vauban. De plus, 41% des isolats de Vauban et 32% des isolats de la Source du Clos de l'Abbaye sont totalement différenciés.

IV.1.2.4/ Comparaison des populations entre les deux eaux de forage (Tableau 22)

Cinquante pour cent des isolats de la Source du Clos de l'Abbaye et 65% des isolats de Vauban sont regroupés (Ia12, Ia2, Iib, IIIa2 et IVa2). Les isolats du groupe IIc et du groupe Iia importants d'un point de vue numérique, sont spécifiques des forages Source du Clos de l'Abbaye et Vauban, respectivement.

IV.1.3/ Considérations taxinomiques et écologiques basées sur les profils d'acides gras

L'Analyse en Composante Principale des profils d'acides gras a révélé 10 groupes et 3 souches non classées (Tableau 23). Ces trois derniers isolats représentaient des souches types telles que *Alcaligenes xyloxydans subsp xyloxydans*, *Oligella urethralis* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Les groupes I et III sont caractérisés par l'abondance d'isolats des griffons, soit respectivement 84% et 85%. Le groupe IX contient seulement des souches provenant de Vauban quelle que soit son origine (griffon ou bouteille), alors que le groupe X ne présente que des souches de ce griffon et le groupe II que des isolats des eaux embouteillées. Les groupes IV et V sont caractérisés par une large proportion de souches types, soit respectivement 70% et 67%. Le groupe VI était constitué par quelques souches types mais essentiellement par une large population d'isolats des eaux embouteillées (75%). Les principaux acides gras pris en considération dans cette analyse sont les suivants: C15:0 iso, C15:0 ante iso, 16:0 iso, C16:0, C16:1 cis, C16:0 méthyle, C17:0 cyclo et C18:1 cis (Tableau 24).

Il apparaissait difficile d'assimiler nos isolats à des espèces dont les souches type sont incluses dans l'analyse. En effet, de nombreux groupes possèdent des souches types représentant différentes espèces. Nous constatons tout de même une possible assimilation des bactéries des groupes I et VI, respectivement aux espèces *sensu lato* et *sensu stricto* des genres *Flavobacterium* et *Pseudomonas*.

Tableau 24 : Caractérisation des groupes selon les acides gras discriminants

Groupe	C15:0i	C15:0ai	C16:0i	C16:0	C16:1cis	C16:0met	C17:0cyclo	C18:1cis
I	+++	+/-	-	+/-	+	-	-	-
II	-	-	-	+	++	-	+	-
III	+	+++	++	-	-	+	-	-
IV	-	-	-	+++	+++	-	+	+
V	-	-	-	+++	++	-	+/-	+
VI	-	-	-	++	++	-	-	+++
VII	-	-	-	+	+	-	+/-	+++
VIII	-	-	-	++	+	-	-	+++++
IX	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	>+++++
X	+	>+++++	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-

« - » correspond à l'absence ou à la présence de traces de l'acide gras; « + » correspond à 10% du profil d'Acides Gras

IV.1.3.1/ Comparaison entre les population du forage Vauban et ses eaux embouteillées (Tableau 25)

Les groupes I, IV, VI, VII, VIII et IX sont constitués d'isolats du forage et des eaux embouteillées de Vauban. En revanche dans les groupes II, III et X, les isolats sont spécifiques de l'origine, forage ou eaux embouteillées.

IV.1.3.2/ Comparaison entre les populations du forage SDCA et ses eaux embouteillées (Tableau 25)

Comparée aux résultats précédents, la population est plus homogène, 4 groupes pour le forage et 6 groupes pour les eaux embouteillées. Le groupe IV est spécifique du forage source du Clos de l'Abbaye et les groupes V, VII et VIII des eaux embouteillées.

IV.1.3.3/ Comparaison des population entre les deux forages (Tableau 25)

Quarante cinq pour cent des isolats de la source Vauban sont spécifiques du forage. L'ensemble des isolats du forage Source du Clos de l'Abbaye sont agrégés à ceux de Vauban (groupes I, III, IV et VI).

Table 23 : Liste de la classification basée sur le profil d'acides gras des souches isolées de deux eaux minérales à l'émergence et embouteillées (Vauban et Source du Clos de l'Abbaye).

Groupe	Culture de collection ou autre référence	Nommée comme	Origine
I	CIP 102995 ^T	<i>Acidovorax delafieldii</i>	Sol
	NCTC 11099 ^T	<i>Flavobacterium breve</i>	Sécrétion humaine bronchique
	S7F		Griffon SDCA ^b
	S9F		Griffon SDCA
	S18F		Griffon SDCA
	S17F		Griffon SDCA
	S14F		Griffon SDCA
	S15F		Griffon SDCA
	V15F		Griffon Vauban
	V2F		Griffon Vauban
	V4F		Griffon Vauban
	V10F		Griffon Vauban
	V22F		Griffon Vauban
	V9F		Griffon Vauban
	V20F		Griffon Vauban
	V14F		Griffon Vauban
	V28F		Griffon Vauban
	V6F		Griffon Vauban
	CIP 101026 ^T	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Trachéc
	CIP 60.57 ^T	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Fluide spinal de nouveau né
ATCC 4651 ^T	<i>Myroides odoratus</i>		
VB11		Bouteille Vauban	
VB15		Bouteille Vauban	
SB12		Bouteille SDCA	
II	ATCC 23055 ^T	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
	VB17		Bouteille Vauban
	VB12		Bouteille Vauban
	ATCC 23416 ^T	<i>Burkholderia cepacia</i>	Oignon

Suite

III	SB10		Bouteille SDCA
	SB15		Bouteille SDCA
	V3F		Griffon Vauban
	V18F		Griffon Vauban
	V17F		Griffon Vauban
	S10F		Griffon SDCA
	S5F		Griffon SDCA
	S1F		Griffon SDCA
	S2F		Griffon SDCA
	S19F		Griffon SDCA
	S12F		Griffon SDCA
	S3F		Griffon SDCA
S8F		Griffon SDCA	
IV	ATCC 17909 ^T	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Duodénum
	ATCC 15309 ^T	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	
	VB3		Bouteille Vauban
	VB2		Bouteille Vauban
	ATCC 11568 ^T	<i>Brevundimonas diminuta</i>	
	ATCC 17484 ^T	<i>Pseudomonas putida biovar B</i>	Sol
	V12F		Griffon Vauban
	V11F		Griffon Vauban
		<i>Pseudomonas libaniensis</i>	Griffon libanais
	ATCC 11996 ^T	<i>Comamonas testosteronii</i>	Sol
	CIP 104883 ^T	<i>Pseudomonas monteilli</i>	
		<i>Pseudomonas cedrella</i>	Griffon libanais
		<i>Pseudomonas orientalis</i>	Griffon libanais
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	CIP 105470 ^T	<i>Pseudomonas migulae</i>	
	CIP 105469 ^T	<i>Pseudomonas gessardii</i>	
	CIP 105273 ^T	<i>Pseudomonas mandelii</i>	
CIP 103779 ^T	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Endive	
S11F		Griffon SDCA	
S13F		Griffon SDCA	
V	ATCC 8750 ^T	<i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis</i>	
	CCEB 518 ^T	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Argile de la rivière Maas
	SB5		Bouteille SDCA
VI	CIP 102995 ^T	<i>Chryseomonas luteola</i>	Plaie
	ATCC 14909 ^T	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Piscine
	ATCC 10145 ^T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	ATCC 17588 ^T	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Fluide spinal
	ATCC 25411 ^T	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Sol
	ATCC 27511 ^T	<i>Ralstonia pickettii</i>	Trachéotomie
	VB13		Bouteille Vauban
VB9		Bouteille Vauban	

	VB10		Bouteille Vauban
	VB14		Bouteille Vauban
	VB5		Bouteille Vauban
	SB18		Bouteille SDCA
	SB20		Bouteille SDCA
	SB3		Bouteille SDCA
	SB4		Bouteille SDCA
	V5F		Griffon Vauban
	S4F		Griffon SDCA
VII	ATCC 11426 ^T	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Vessie
	ATCC 29837 ^T	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Hôpital respiratoire
	SB23		Bouteille SDCA
	SB10		Bouteille SDCA
	SB14		Bouteille SDCA
	SB22		Bouteille SDCA
	SB8		Bouteille SDCA
	SB18		Bouteille SDCA
	VB6		Bouteille Vauban
	V33F		Griffon Vauban
	V8F		Griffon Vauban
VIII	ATCC 17922 ^T	<i>Acinetobacter</i> <i>genospecies 3</i>	
	ATCC 17440 ^T	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Sinus drainage
	SB6		Bouteille SDCA
	SB17		Bouteille SDCA
	SB7		Bouteille SDCA
	SB13		Bouteille SDCA
	SB9		Bouteille SDCA
	SB21		Bouteille SDCA
	SB1		Bouteille SDCA
	VB1		Bouteille Vauban
	V1F		Griffon Vauban
	V19F		Griffon Vauban
	V16F		Griffon Vauban
	V21F		Griffon Vauban
	V23F		Griffon Vauban
IX	CIP 82.115 ^T	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
	V24F		Griffon Vauban
	V25F		Griffon Vauban
	V31F		Griffon Vauban
	CIP 102557 ^T	<i>Psychrobacter immobilis</i>	
	VB7		Bouteille Vauban
	VB16		Bouteille Vauban
X	V29F		Griffon Vauban
	V27F		Griffon Vauban

	V26F		Griffon Vauban
	V32F		Griffon Vauban
Non classé	ATCC 27061 ^T	<i>Alcaligenes xyloxidans subsp xyloxidans</i>	Dépôt auriculaire
	CIP 103116 ^T	<i>Oligella urethralis</i>	Oreille
	ATCC 13637 ^T	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Région Oropharyngique

^a ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, Germany; CCEB, Culture Collection of Entomogenous Bacteria, Prague, Czechoslovakia; NCTC, National Collection of Type Cultures, London, United Kingdom; CIP, Collection bactérienne de l'Institut Pasteur de Paris, France.

^b SDCA, Source du Clos de l'Abbaye

Tableau 25 : Analyse des résultats de la classification basée sur les acides gras

Type d'eau	Groupes résultant de la classification via les profils d'Acides Gras	Correspondance entre forage	Correspondance entre bouteille	
Forage Vauban	I [§] (V22F, V9F, V20F, V14F, V15F, V2F, V4F, V (10F, V28F, V6F)			
	III (V3F, V18F, V17F)			
	IV (V12F, V11F)			
	VI (V5F, V10F)			
	VII (V8F, V33F)			
	VIII (V1F, V19F, V16F, V21F, V23F)			
	IX (V24F, V25F, V31F)			
	X (V29F, V27F, V26F, V32F)			
	Forage SDCA			I [§] (S14F, S17F, S15F, S18F, S7F, S9F)
				III [§] (S10F, S5F, S1F, S2F, S19F, S12F, S3F, S8F)
IV (S11F, S13F)				
VI (S4F)				
Bouteille Vauban	I (VB11, VB15)			
	II (VB17, VB12)			
	IV (VB3, VB2)			
	VI [§] (VB10, VB14, VB5, VB13)			
	VII (VB16)			
	VIII (VB1)			
	IX (VB7, VB16)			
Bouteille SDCA	I (SB12)			
	III (SB10, SB15)			
	V (SB5)			
	VI (SB20, SB18, SB3, SB4)			
	VII [§] (SB23, SB10, SB14, SB22, SB8, SB18)			
	VIII [§] (SB6, SB17, SB13, SB7, SB9, SB21, SB1)			

Groupes spécifiques du forage ou des eaux embouteillées dans une même source. [§] population dominante. Groupes dont les isolats sont spécifiques de la source (Vauban ou SDCA). Souches agrégées de la même façon dans les deux classifications, biochimique ou fondée sur les acides gras.

IV.1.2.4/ Comparaison des populations entre les eaux embouteillées (Tableau 25)

Quatorze pour cent des isolats de la Source du Clos de l'Abbaye sont regroupés dans un tiers des groupes de la classification fondée sur les acides gras et sont spécifiques de ces eaux embouteillées. De nombreux isolats s'agrègent quelle que soit l'eau embouteillée dans des groupes importants quantitativement. Quarante trois pour cent des isolats Vauban (3 groupes sur 7) s'agrègent aux isolats de la Source du Clos de l'Abbaye.

Entre les classifications définies sur les profils biochimiques et ceux des acides gras, quelques souches s'agrègent de la même manière et constituent des groupes similaires voire identiques (forage Vauban: Ia2 et IV, IIa et IX; bouteille Vauban: IVa2 et IV; forage SDCA: IIc et III; bouteille SDCA: SB12 non classée et I). Cependant, lors de la classification basée sur les acides gras, dans la majorité des cas nous avons observé un redéploiement des souches et la disparition d'isolats non classés. Comparée à la classification biochimique, la dispersion des isolats sur la base de leurs profils d'acides gras apparaît semblable ou diminuée, essentiellement dans le cas de la Source du Clos de l'Abbaye.

IV.2/ Discussion

De nombreux auteurs (Quevedo-Sarmiento *et al.* 1986 ; Guillot et Leclerc 1993 ; Zheng et Kellogg 1994 ; Ferreira *et al.* 1996 ; Atkinson *et al.* 1997 ; Campbell *et al.* 1997 ; Tan 1997 ; Tsai *et al.* 1997) identifient la microflore de l'environnement aquatique à l'aide de profils biochimiques obtenus avec différentes galeries (API 20NE, BBL crystal, BIOLOG GN, Vitek,...). A partir de ces systèmes miniaturisés, l'identification des bactéries est obtenue numériquement. Elle est fondée sur le calcul de la probabilité pour une souche inconnue d'appartenir à une espèce incluse dans la base de données du système. De tels systèmes d'identification sont disponibles pour identifier une large gamme de bactéries, rencontrée en bactériologie clinique et en hygiène alimentaire, telle que les anaérobies, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, Gram négatif non fermentatif, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* (Busse *et al.* 1996)... Les tests sont parfois utilisés pour la classification de nouveaux taxons comme *Hydrogenophaga* (Willems *et al.* 1989), *Acidovorax* (Willems *et al.* 1990), *Sphingomonas* (Yabuuchi *et al.* 1990), *Brevundimonas* (Segers *et al.* 1994).

Les résultats sont plus ou moins convainquants et fiables selon les études. Dans notre cas, ils apparaissent comme un échec, car peu de nos isolats sont assimilés aux souches types testées.

Certains auteurs attribuent de telles divergences aux habitats spécifiques de ces micro-organismes (Wunsche et Babel 1996), d'autres aux lacunes des bases de données (Atkinson *et al.* 1997). Ces échecs d'identification peuvent s'expliquer par:

(1) une espèce bactérienne regroupe une population présentant différents phénotypes qui peuvent être affectés par la présence ou non de plasmides codant pour certaines fonctions métaboliques.

(2) parfois des modifications portant sur la température d'incubation, le temps d'incubation, le liquide de suspension, la taille de l'inoculum sont nécessaires afin d'adapter ces systèmes d'identification aux isolats environnementaux inconnus.

(3) les souches sauvages peuvent montrer des profils de réactions différents, comparés aux isolats stockés ou sub cultivés dans le laboratoire.

Les populations bactériennes dans une grande proportion diffèrent selon leurs profils biochimiques entre les forages et les bouteilles. Ces observations rendent compte probablement d'espèces bactériennes différentes mais également et certainement de conditions nutritionnelles et physico-chimiques différentes. Ainsi, les groupes propres aux eaux minérales embouteillées indiquent l'existence de bactéries tout particulièrement adaptées à la chaîne de conditionnement.

Les forages ont des populations dominantes spécifiques qui démontrent l'existence de caractéristiques biologiques et/ou physico-chimiques distinctes entre les eaux, malgré une proximité géographique. Cette observation est en accord avec l'origine pluviale des bactéries. En effet, les eaux de la Source du Clos de l'Abbaye plus profonde résulte d'une plus longue infiltration et certainement d'une plus grande sélection, d'où une diversité réduite. Kölbel *et al.* (1988a, 1988b) ont déjà montré que ces communautés microbiennes sont très diverses et différentes d'un niveau à l'autre (Balkwill 1989; Zengh et Kellogg 1994).

L'analyse des profils d'acides gras est bien introduite dans la classification et l'identification. L'importance de cette méthodologie pour l'identification repose sur de nombreuses différences au niveau des molécules : (i) longueur des chaînes (8 à 20) ; (ii) présence d'acides gras saturés et insaturés ; (iii) présence d'acides gras ramifiés ; (iv) présence d'acides gras cyclopropanes ; (v) présence d'acides gras hydroxylés. Les traits spécifiques d'un groupe phénotypique peut reposer sur la présence dominante d'un seul acide gras ou sur un profil particulier d'acide gras. Conformément aux travaux de Busse *et al.* (1996) et de Kampfer *et al.* (1992), seul un nombre restreint d'acides gras (6 à 10) semble indispensable pour différencier les micro-organismes. Les chaînes des acides gras extraits ne possèdent que 12 à

18 carbones et la valeur relative a un rôle très important dans la discrimination des différents micro-organismes, particulièrement pour le C18:1 *cis*. Bien que nos isolats appartiennent tous à la catégories des bacilles à Gram négatif, les acides gras hydroxylés (caractéristique du LPS) ne sont pas discriminant dans le cadre d'études écologiques conformément aux travaux de Zelles (1997),

Lors de cette classification, nous obtenons une plus grande discrimination des micro-organismes analysés ; en effet, le nombre de groupes augmente et aucun isolat est non classé. Dans les conditions standard de détermination du profil d'acides gras (MIS) que nous avons adopté, nous notons une influence moindre des conditions environnementales sur le profil d'acides gras que sur le profil biochimique. Il existerait une homogénéisation du profil biochimique lors de l'adaptation bactérienne aux conditions physico-chimiques et nutritionnelles du milieu. Cette remarque est confirmée par les travaux de Buyer et Drinkwater (1997). Suite à l'analyse d'acides gras et des tests d'utilisation de substrats, ils suggèrent que des communautés microbiennes différentes structurellement sont similaires fonctionnellement.

Il existe peu de travaux qui tentent de corréler la flore microbienne des eaux embouteillées avec d'autres caractéristiques tels que l'âge de l'eau, la géologie de l'aquifère, ses caractéristiques chimiques, la technologie d'extraction, le type et la taille du contenant et le stockage après embouteillage (Hunter 1993). Comme dans notre cas, Bischofberger *et al.* (1990) montrent que la nature et le taux de la flore microbienne peut différer entre deux sources. Ici, il s'agit d'une différenciation basée sur le statut nutritionnel. En effet, comme le suggèrent Johannes *et al.* (1997), la sélectivité écologique peut être basée sur l'utilisation d'un substrat spécifique qui n'est pas disponible pour une majorité d'autres micro-organismes (Dewliegher *et al.* 1995 ; Senso *et al.* 1992). Campbell *et al.* (1997) montrent ainsi que l'utilisation bactérienne de quelques sources particulières de carbone constitue une technique économique et efficace pour une étude écologique.

IV.3/ Conclusion

De part leurs propriétés physiologiques et leurs milieux d'origine, nos isolats peuvent être reconnus comme des représentants typiques d'eau de source et d'eau de consommation en général, comme le suggèrent Schwaller et Schmidt-Lorenz (1981).

Les changements dans les populations spécifiques majeures le long de la chaîne d'embouteillage peuvent indiquer des altérations dans l'eau à la source ou des modifications

Peut-être que rien n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela. 155

Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

dans l'embouteillage. Comme Morais et Da Costa (1990), nous constatons l'intérêt de mettre en place le label « flore native » de la source et de l'eau embouteillée dans les contrôles microbiologiques (Ferreira et al. 1996).

Cette approche numérique est importante dans l'établissement d'information de base pour ces aquifères (Mc Carthy et Murray 1996) ; le groupement des isolats selon le consensus des sources de carbone ou des profils d'acides gras peut être en particulier utilisé comme base lors d'une future investigation de la microflore indigène de ces aquifères ou lors de comparaisons avec d'autres études.

De plus, les recherches sur la physiologie et la biochimie comparative doivent être pérennisées, car bien que la taxonomie soit importante, nous savons que les bactéries sont intéressantes plus pour ce qu'elles font que pour ce qu'elles sont (Grimont et al. 1996).

V/ Etude de la viabilité et de la cultivabilité des bactéries des eaux minérales

V.1/ La cultivabilité sur gélose Plate Count Agar (PCA) de la microflore de nos eaux minérales embouteillées

Dans cette expérience, les bouteilles sont agitées avant de réaliser les dénombrements. Le milieu utilisé pour rendre compte de la population viable cultivable est la gélose PCA et la température est de 20°C. Ces conditions sont conformes à celles des contrôles microbiologiques décrites dans les textes officiels (Anon. 1980).

Immédiatement après l'embouteillage, la population bactérienne hétérotrophe dénombrée sur milieu PCA est faible. Les moyennes des Sources du Clos de l'Abbaye et de Vauban sont respectivement de 28 et 203 UFC/ml.

Une augmentation rapide de la population est ensuite observée et un maximum est atteint au cinquième jour (Figure 19). La microflore de l'eau embouteillée de la Source Vauban est alors trois fois plus élevée que celle du Clos de l'Abbaye.

Par la suite, la population à 20°C décroît lentement mais de façon appréciable ; en vingt cinq jours, il y a une perte d'un log pour la Source du Clos de l'Abbaye et une diminution de moitié de la population de la source Vauban.

Discussion

Les évolutions des populations bactériennes immédiatement après l'embouteillage sont maintes fois décrites, quels que soient la nature de l'eau, du conditionnement, du prélèvement et des méthodes d'analyses (Yurdusev et Ducluzeau 1985 ; Gonzalez *et al.* 1987 ; Bischofberger *et al.* 1990 ; Morais et Da Costa 1990).

Comparément à ces travaux, les populations maximales sont atteintes en 5 jours et les dénombrements obtenus pour les deux sources embouteillées correspondent aux estimations moyennes, de l'ordre de 10^4 - 10^5 bactéries viables cultivables par millilitre. La population des deux eaux se comporte de façon identique. La microflore des eaux de Vauban montrent cependant une potentialité de croissance bactérienne plus importante que celle des eaux de la Source du Clos de l'Abbaye.

Cette augmentation de la microflore pourrait être expliquée par une oxygénation, l'apport de nutriments, l'augmentation de la température, et(ou) l'existence de surface d'adhésion pour les eaux embouteillées (Fleet et Mann 1986 ; Warburton 1986 ; Bischofberger *et al.* 1990).

Le déclin de la population observé après la première semaine est en revanche atypique. La plupart des auteurs (Bischofberger *et al.* 1990 ; Hunter 1993) montre en général une stabilité des effectifs suite à la croissance rapide des micro-organismes.

V.2/ Optimisation des dénombrements des bactéries des eaux minérales : choix des milieux de culture

Les résultats sont analysés statistiquement par le test de Student et le test de Snedecor selon l'appariement des échantillons.

V.2.1/ Source du Clos de l'Abbaye (Figures 20 et 21)

Quel que soit le temps de stockage des bouteilles, nous obtenons un dénombrement plus important pour le milieu R2A (Figures 20A, B et C). L'efficacité de ce milieu comparée aux géloses PCA et PCA/10 est d'autant plus flagrant que la durée d'entreposage des bouteilles augmente. Les écarts de dénombrement des cellules viables cultivables sur ces différents milieux s'avèrent en effet de plus en plus élevés.

une semaine : $Nb_{R2A} = 2Nb_{PCA/10} = 3Nb_{PCA}$

un mois : $Nb_{R2A} = 2,5Nb_{PCA/10} = 12Nb_{PCA}$

trois mois : $Nb_{R2A} = 8Nb_{PCA/10} = 17Nb_{PCA}$

Une diminution de la microflore viable cultivable des eaux embouteillées est observée lors d'un stockage prolongé. Cette baisse varie selon le milieu. Elle apparaît significative pour les milieux de culture PCA/10 et PCA (environ $4 \cdot 10^4$ à $2 \cdot 10^3$ UFC/ml et $2 \cdot 10^4$ à $1 \cdot 10^3$ UFC/ml respectivement).

Après une semaine d'entreposage des bouteilles, la flore microbienne n'est mise en évidence qu'au bout de trois jours d'incubation des boîtes de Pétri. Les pourcentages obtenus pour R2A, PCA/10 et PCA représentent respectivement 62, 19 et 62% du nombre total obtenu après 21 jours d'incubation sur ces différents milieux. Quasiment identiques après sept jours d'incubation, ils sont en moyenne de 90%.

Après un mois de stockage des bouteilles, les colonies n'apparaissent qu'après sept jours sur milieu R2A. Sur les géloses PCA et PCA/10 les colonies apparaissent dès le troisième jour d'incubation mais les pourcentages sont faibles, 25 et 3%. Au bout d'une semaine d'incubation les pourcentages redeviennent équivalents, aux alentours de 70%.

Après que les bouteilles aient séjourné trois mois à l'étuve, la microflore est mise en évidence sur les trois milieux au bout de trois jours. Les pourcentages apparaissent alors très

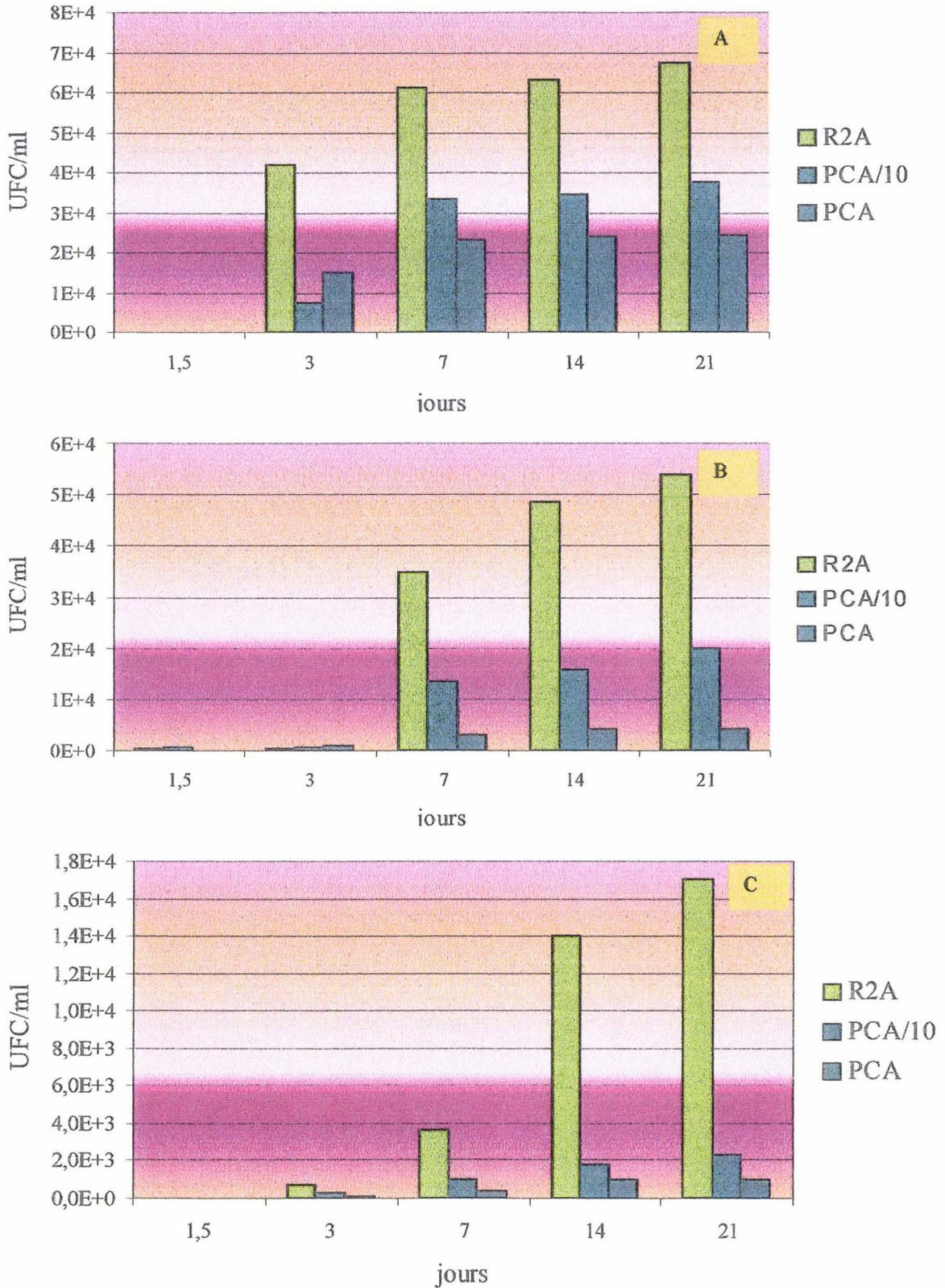


Figure 20 : Dénombrement de la flore viable cultivable de l'eau minérale SDCA après 1 semaine (A), 1 mois (B) et 3 mois (C) de stockage des produits finis à 20°C, sur 3 milieux gélosés (R2A, PCA et PCA/10) incubés jusqu'à 21 jours à 20°C.

Les dénombrements sont traités statistiquement par la loi de Student ou de Snedecor selon l'appariement.

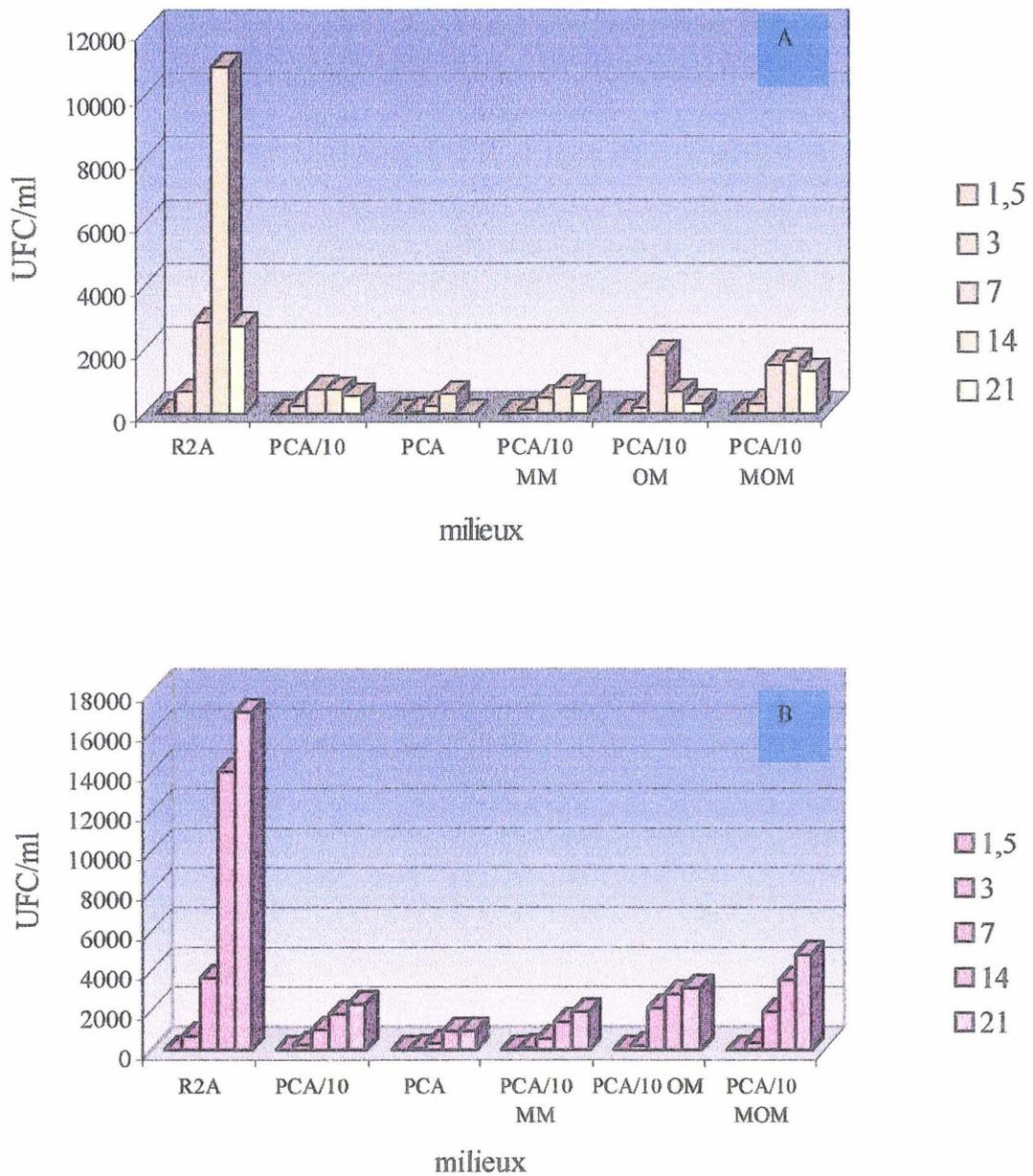


Figure 21 : Dénombrement (apparition (A) et cumul (B)) de la microflore viable et cultivable de la source du Clos de l'Abbaye, stockée 3 mois à 20°C, sur six milieux gélosés (R2A, PCA, PCA/10, PCA/10 Matière Minérale, PCA/10 Matière Organique et PCA/10 Matières Organiques et Minérales) incubés 21 jours à 20°C.

Les dénombresments sont traités statistiquement par la loi de Student ou de Snedecor selon l'appariement.

faibles, 4% (R2A), 12% (PCA/10) et 8% (PCA). Même après une semaine, aucun des pourcentages n'excèdent 45% (PCA/10). Il faut 15 jours pour mettre enfin en évidence 82% (R2A), 78% (PCA/10) et 100% (PCA) de la microflore viable cultivable totale des eaux embouteillées sur les milieux correspondants.

Lors de la troisième campagne d'analyse (figure 21), l'ajout de matières minérales et de matières organiques au milieu PCA/10 est effectué pour mimer la composition qualitative du milieu R2A. Les numérations sur milieu R2A restent optimales et significativement différentes de celles réalisées sur les milieux additionnés de compléments minéraux et organiques.

V.2.2/ Source Vauban (Figures 22 et 23)

Les dénombrements obtenus sur les différents milieux après une semaine d'entreposage des bouteilles sont similaires. Dès la première lecture, nous constatons la formation de colonies.

En fonction du temps de stockage des eaux embouteillées, nous remarquons une baisse des nombres d'UFC. Cette baisse est significative pour les milieux de culture PCA/10 et PCA. Le nombre de cellules viables cultivables mis en évidence sur les milieux de cultures est donc fonction du temps d'entreposage.

Suite à la première semaine de stockage, nous obtenons 70% de la microflore totale lors de la première lecture. Dès le troisième jour, la totalité des bactéries cultivables est quasiment atteinte, et cela, quel que soit le milieu testé.

Après un mois, les pourcentages obtenus au bout d'1,5 jour apparaissent plus bas, 24% (R2A), 17% (PCA/10) et 45% (PCA).

Après trois mois de stockage des bouteilles, les pourcentages, lors de la première lecture sont très faibles, 5% (R2A) et 7% (PCA/10 et PCA). La deuxième lecture à trois jours ne permet de dénombrer que 40% de l'effectif total sur R2A, alors que sur PCA/10 et PCA 75 et 88% respectivement des valeurs atteintes après 21 jours sont déjà observées.

La comparaison des performances du milieu R2A et des milieux PCA et PCA/10 supplémenté (Figure 23) nous conduit aux observations suivantes :

- Le milieu R2A reste le plus efficace.
- L'ajout de minéraux au milieu PCA/10 n'a aucun effet sur la cultivabilité de la microflore totale.

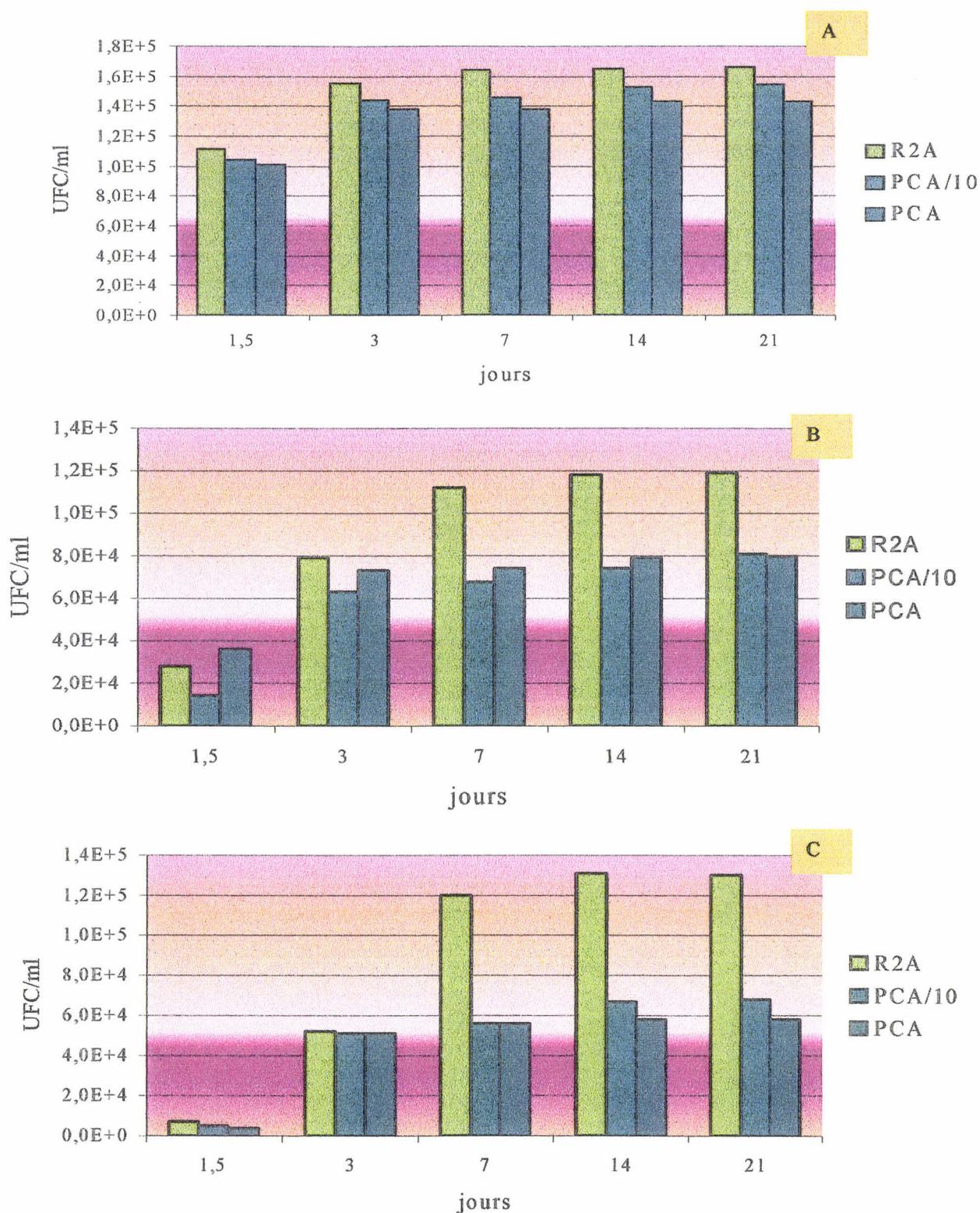


Figure 22 : Dénombrement de la flore viable cultivable de l'eau minérale Vauban après 1 semaine (A), 1 mois (B) et 3 mois (C) de stockage des produits finis à 20°C, sur 3 milieux gélosés (R2A, PCA et PCA/10) incubés jusqu'à 21 jours à 20°C. Les dénombrements sont traités statistiquement par la loi de Student ou de Snedecor selon l'appariement.

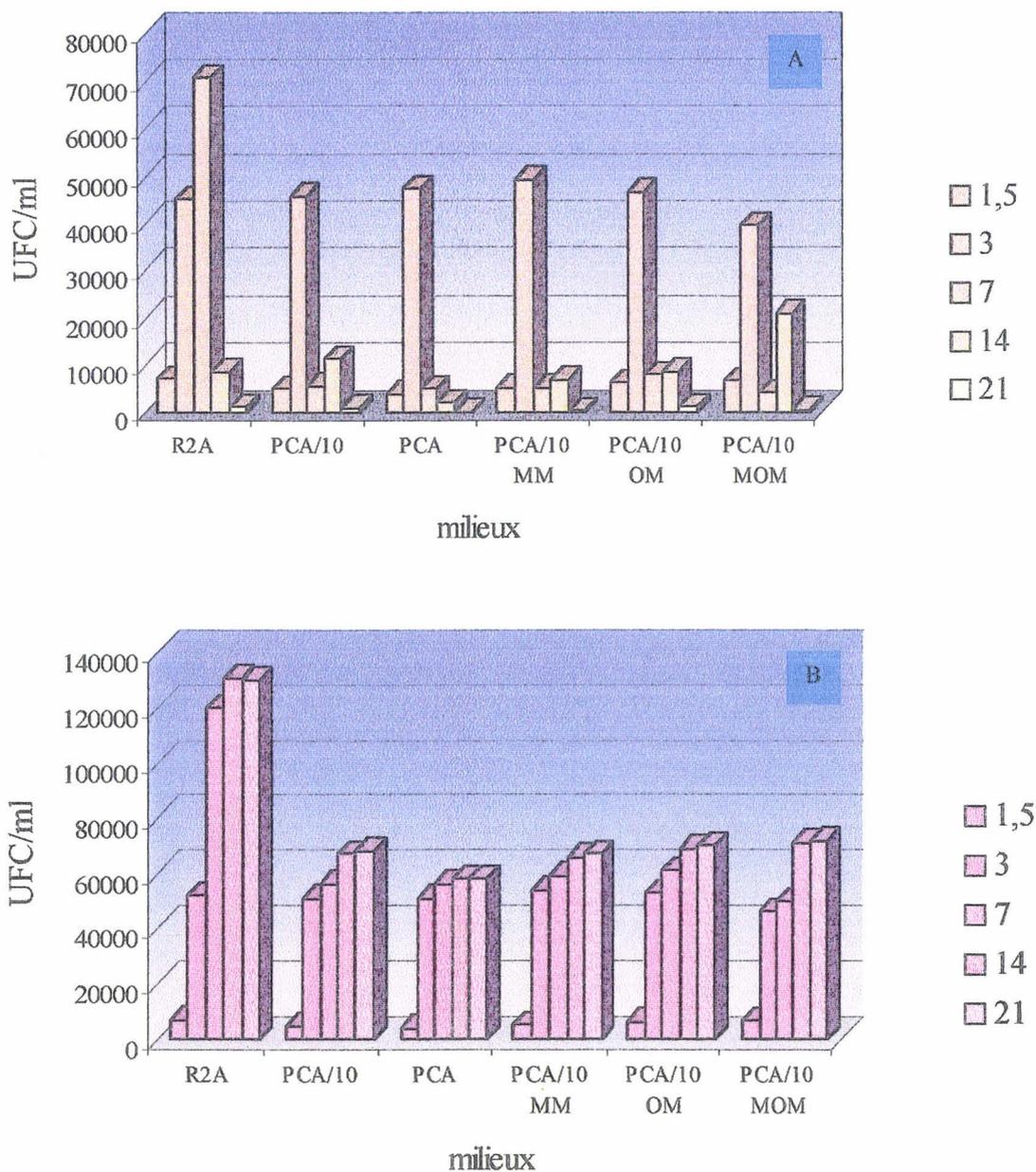


Figure 23 : Dénombrement (apparition (A) et cumul (B)) de la microflore viable et cultivable de la source Vauban, stockée 3 mois à 20°C, sur six milieux gélosés (R2A, PCA, PCA/10, PCA/10 Matière Minérale, PCA/10 Matière Organique et PCA/10 Matières Organiques et Minérales) incubés 21 jours à 20°C.

Les dénombrements sont traités statistiquement par la loi de Student ou de Snedecor selon l'appariement.

- Au contraire, une infime augmentation du nombre d'UFC est observé lors d'ajout de matières minérales et organiques.

Discussion

Les résultats montrent clairement que les sources SDCA et Vauban possèdent une microflore différente. Comparées à la microflore de la source Vauban, les bactéries de la source du Clos de l'Abbaye sont moins nombreuses à to et présentent une croissance plus lentes sur milieux gélosés. Ces bactéries sont soit de types physiologiques distincts, soit présentent diverses facilités d'adaptation en raison de leur origine.

Le temps d'incubation est un paramètre influent sur les résultats (Haldeman *et al.* 1995). Une prolongation de la durée d'incubation permet en général d'obtenir un nombre plus important des populations bactériennes de l'environnement (Bischofberger *et al.* 1990).

Cependant pour des raisons analytiques, un temps minimum d'incubation est souhaitable. Celui retenu dans les normes françaises (3 jours) s'avère trop court car il ne permet pas de donner des résultats représentatifs, quantitativement et qualitativement. Certains auteurs soulignent qu'une standardisation (milieux, temps d'incubation, température) semble impossible à réaliser en raison de réponses bactériennes très variables en fonction des sites environnementaux étudiés (Fry et Tallat 1982 ; Reasoner et Geldreich 1985). Une diminution de la température d'incubation (environ 20°C) et un allongement de la durée d'incubation semble nécessaire pour recouvrir le maximum de bactéries viables et cultivables (Fry et Tallat 1982 ; Reasoner et Geldreich 1985 ; Williams *et al.* 1993). Nos résultats sont conformes à ces résultats.

Quant aux milieux de cultures, il est évident que le R2A donne les meilleurs résultats car il permet l'expression du plus grand nombre de bactéries viables cultivables, comme le démontrent Reasoner et Geldreich (1985).

Le milieu PCA apparaît comme le milieu le plus inhibiteur dans la révélation des cellules viables cultivables (Schwaller et Schmidt-Lorenz 1980). Par contre, les milieux riches révèlent un plus grand nombre de colonies pigmentées, comme le constatent également Mavridou (1992) et Palumbo *et al.* (1996). Différents auteurs (Palumbo *et al.* ; 1996) mettent ainsi l'accent sur l'efficacité et la fiabilité des dénombrements des colonies sur milieux riches en matière organique, dans les études concernant la diversité microbienne.

Tableau 26 : Détermination du nombre de bactéries viables et cultivables dans des bouteilles (SDCA) incubées pendant 5 jours à 20°C et additionnées de glucose, de chlorure d'ammonium (NH₄Cl), de peptone ou de sulfure de sodium (Na₂S).

Supplément	Concentration	Nombre d'UFC/ml dans les bouteilles de	
		1 st analyse	2 nd analyse
Glucose (g/l)	0	$7,1 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ *	$3,1 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$
	0,1	$1,2 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$
	0,5	$1,2 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$
	1,0	$9,8 \times 10^4 \pm 4,5 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4 \pm 6,3 \times 10^4$
NH ₄ Cl (g/l)	0	$4,6 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$
	0,1	$6,9 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4 \pm 3,9 \times 10^4$
	0,5	$7,7 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^3$	$3,2 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^5$
	1,0	$1,0 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5 \pm 9,3 \times 10^4$
Peptone (g/l)	0	$4,6 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4 \pm 3,2 \times 10^3$
	0,5	$1,2 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^5$	$9,6 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^5$
	1,25	$4,8 \times 10^6 \pm 7,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^7 \pm 4,9 \times 10^6$
	2,5	$9,1 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7 \pm 2,6 \times 10^7$
Na ₂ S (mg/l)	0	$4,8 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$
	62,5	$2,7 \times 10^4 \pm 6,4 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4 \pm 4,2 \times 10^3$
	187,5	$2,9 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$
	562,5	$1,4 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^3$

* écart type (n=2)

La gélose PCA/10 moins riche qualitativement en nutriments que R2A, révèle une population viable cultivable plus faible. Par conséquent, les concentrations en matière nutritive ne sont pas les seuls facteurs influents, mais par contre la nature de ces nutriments paraît primordiale. Ces constatations sont d'autant plus marquées que la microflore a séjourné longuement dans l'eau embouteillée. Les micro-organismes présents plus ou moins longtemps dans l'eau minérale sont davantage dépendants de la nature de l'apport nutritif. La forte teneur en nutriment s'avère donc être un stress (Williams *et al.* 1994 ; Bischofberger *et al.* 1990) pour la mise en évidence des micro-organismes viables cultivables potentiels. Non seulement, cette biomasse apparaît alors plus lentement sur gélose PCA et PCA/10 mais elle est aussi sous évaluée par rapport à la population rencontrée sur R2A. Ceci signifie que certaines bactéries mettent plus de temps à s'adapter alors que d'autres restent en l'état viable non cultivable. Cette expérience conforte l'hypothèse suivante : la population viable non cultivable ne constitue pas une flore atypique, mais simplement une microflore inadaptée à des conditions de cultivabilité.

Ces résultats semblent en désaccord avec Schut *et al.* (1997) qui pensent que ces ultramicrobactéries indigènes sont issues de taxons non identifiés formant des groupes bactériens totalement inconnus.

Les croissances bactériennes sur milieux PCA ou PCA/10 supplémentés n'égalent jamais celle observée sur R2A. Avec des concentrations analogues en substances nutritives, le PCA/10+MOM (matières organiques et minérales) montre toutefois une population plus faible et des taux de croissance moindre que sur milieu R2A. Des différences sur la nature de l'apport protéique (peptone) et la teneur en extrait de levure avantagent donc la microflore viable cultivable sur R2A.

V.3/ Etude de facteurs biochimiques influençant l'évolution des populations bactériennes viables et cultivables des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye: recherche de facteurs limitant

L'évolution de la microflore est répertoriée dans le Tableau 26. Les phénomènes observés sont reproductibles lors des deux analyses, et entre les bouteilles d'un même lot. Quelle que soit la concentration en glucose testée, les numérations sont similaires à celles des témoins. Il en est de même pour les bouteilles supplémentées en chlorure d'ammonium et en sulfure de sodium.

En revanche, l'apport d'azote organique sous forme de peptone, entraîne une élévation de la population bactérienne de l'ordre de trois log. Le phénomène est donc conséquent.

Discussion

Malgré une population bactérienne aérobie, la réduction de l'eau minérale par un agent chimique Na_2S n'a eu aucune influence sur la croissance des micro-organismes. Le taux d'oxygénation des eaux nécessaires au bon développement bactérien s'avèrent donc relativement faible. L'oxygénation lors de l'embouteillage ne semble pas faire partie des facteurs influents sur la croissance bactérienne des eaux commercialisées.

Dans le cas d'ajout de matière carbonée simple telle que le glucose, aucune modification n'est observée. Deux hypothèses peuvent être émises :

- le glucose n'est pas métabolisé par ces micro-organismes
- un autre facteur limitant empêche une croissance accrue avec cette forme de carbone.

Seule la seconde hypothèse est retenue, car la majorité des espèces isolées des eaux minérales étudiées sont reconnues comme métabolisant le glucose en aérobiose. Schut *et al.* (1997) suggèrent d'ailleurs que l'utilisation du glucose est mineure dans des conditions naturelles.

L'addition de peptones (azote organique) donne une population bactérienne plus élevée que les témoins. Ce phénomène n'est pas observé avec l'adjonction d'azote minérale (NH_4Cl).

Ces résultats montrent que l'azote seul ne suffit pas pour influencer la croissance des micro-organismes. Un ou plusieurs facteurs limitant contenus dans les peptones sont indispensables pour pallier les limites de croissance bactérienne observées dans cette eau minérale. Ces composés sont vraisemblablement des acides aminés, en accord avec les remarques de l'étude précédente. Goïl *et al.* (1998) confirment l'importance de l'azote ; Nelson *et al.* (1997) constatent la décroissance de nombre d'UFC chez *Vibrio anguillarum* au cours d'une carence en azote ; d'autres montrent une synthèse protéique *de novo* en réponse à ce jeûne (Groat *et al.* 1986).

Enfin, Mc Kay (1992) démontre lors du jeûne un accroissement du taux de dégradation protéique; les acides aminés libérés servent alors à la synthèse de protéines spécifiques requises pour la survie au cours de carence (Matin 1991 ; Marouga 1996 ; Paludan-Mülle 1996).

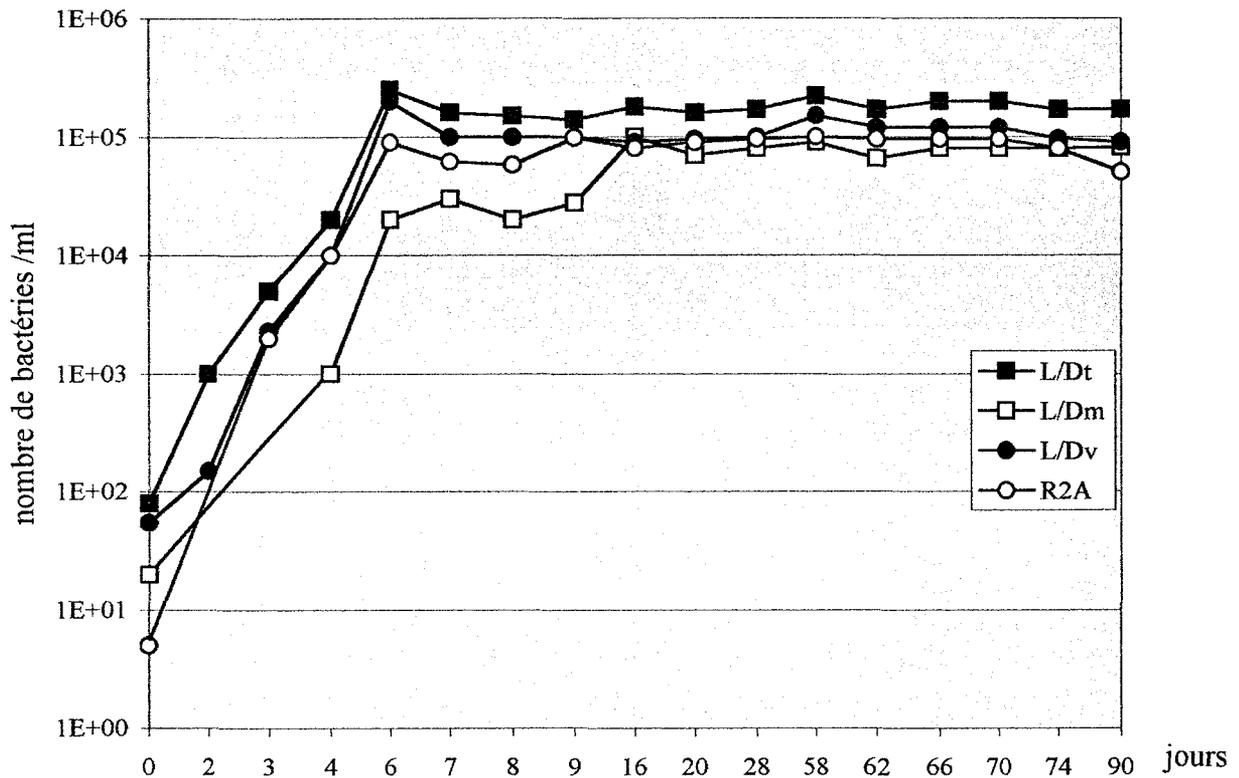


Figure 24: Evolution du nombre de bactéries totales (■), viables (●), cultivables (○) et mortes (□) dans les eaux prélevées au niveau du forage, avec déterminations des cellules cultivables sur milieu gélosé R2A. Les autres dénombrements sont obtenus après coloration au LIVE/DEAD®.

Chaque résultat correspond à la moyenne de 3 essais (n) dont l'écart type (σ) n'excède pas 5% des valeurs expérimentales.

V.4/ Etude des états de dormance de la microflore des eaux minérales de Vauban

L'évolution des différents types bactériens, bactéries totales, viables et cultivables (VC), viables mais non cultivables (VNC) et mortes, au cours du temps dans les eaux minérales naturelles collectées à la source Vauban est rapportée sur la Figure 24. Le nombre total et initial de bactéries est très bas (<10 bactéries/ml) et parmi celles-ci, seulement 2 à 3 bactéries/ml sont cultivables sur milieu R2A. Les concentrations cellulaires augmentent considérablement et après 6 jours de stockage, elles atteignent environ 3.10^5 bactéries/ml avec 25% de cellules mortes, 65% de cellules viables cultivables et 10% de viables non cultivables. Durant le stockage prolongé, les dénombrements de la flore totale et morte fluctuent puis se stabilisent. Les cellules viables cultivables décroissent progressivement, alors que certaines deviennent viables mais non cultivables. Après 90 jours, le nombre de cellules mortes représente 50% du nombre de bactéries totales, pour 25% de viables cultivables et 25% de viables non cultivables.

Immédiatement après l'embouteillage mécanique, le nombre de bactéries totales (Figure 25), déterminé avec le fluorochrome Live/Dead est beaucoup plus élevé que dans les expériences antérieures (Figure 24); nous pouvons suggérer l'introduction dans les bouteilles d'une large quantité de bactéries allochtones. La concentration cellulaire est de 5.10^5 bactéries/ml mais seulement 1% est viable cultivable, 19% viables mais non cultivables et 80% mortes. Cette mortalité indique que l'embouteillage conduit à d'importants effets sur la microflore. Ensuite, le nombre de bactéries viables décroît alors que le nombre de cellules viables cultivables augmentent pendant une brève période. Cette croissance résulte d'un apport nutritif, dû à de la mortalité des bactéries viables non cultivables et à la lyse de cellules mortes. Cette lyse induit une large augmentation de la population bactérienne avant une diminution marquée, puis une stabilisation de la microflore totale aux environs de 10^5 cellules/ml. Pourtant les différentes sous-populations ne fluctuent pas de la même façon. La lyse des cellules mortes reste très importante, permettant un léger apport nutritif et la vie d'une large proportion de cellules parmi la communauté entière. Après 3 mois, le nombre total de bactéries dans les bouteilles prélevées au niveau de la chaîne d'embouteillage est d'environ 10^5 bactéries/ml; 70% sont viables cultivables, 12% viables non cultivables et seulement 18% sont mortes.

Afin de caractériser ces changements dans la communauté bactériennes, les isolats retrouvés sur R2A sont regroupés dans 6 classes selon la pigmentation des colonies (Tableau 27). Les isolats étaient des bâtonnets à Gram négatif, le plus souvent oxydase positive, incapables de fermenter le glucose mais parfois capables de l'assimiler par d'autres voies métaboliques.

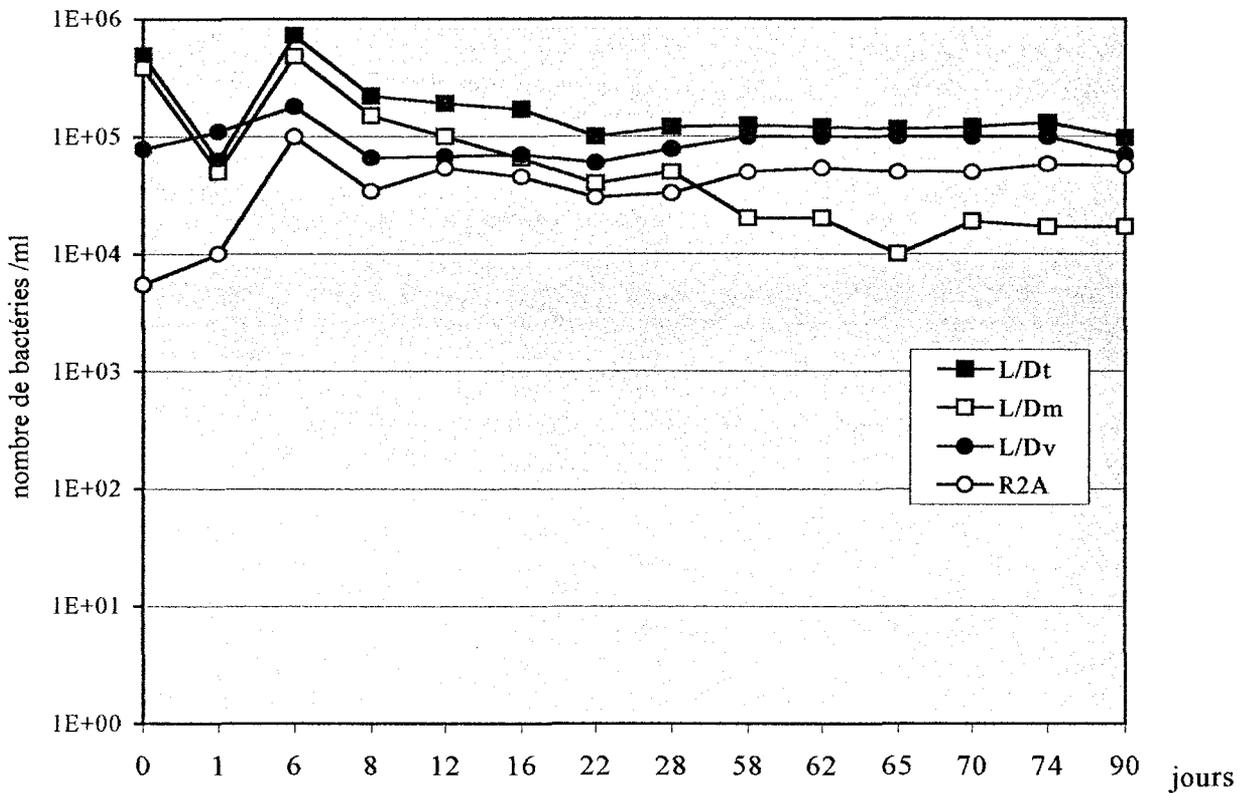


Figure 25: Evolution du nombre de bactéries totales (■), viables (●), cultivables (○) et mortes (□) dans l'eau minérale embouteillée Vauban. Détermination des cellules cultivables sur gélose R2A. Les autres dénombrements sont obtenus après coloration au LIVE/DEAD®. Chaque résultat correspond à la moyenne de 3 essais (n) dont l'écart type (σ) n'excède pas 5% des valeurs expérimentales.

Utilisant le système d'identification API 20NE, 44 souches sont étudiées parmi lesquelles seulement 18 peuvent être identifiées avec une bonne ou acceptable discrimination. Les fréquences des groupes rencontrées dans les eaux à la source ou prélevées sur la chaîne d'embouteillage, stockées 90 jours dans des bouteilles en PET sont variées. Certaines (O, R, M) forment des groupes minoritaires. Parfois, ils apparaissent importants initialement mais disparaissent rapidement, d'autres sont permanents ou apparaissent irrégulièrement résultant de changements de la nature des bactéries, de l'état viable non cultivable à l'état viable cultivable. Pour les mêmes raisons, d'autres types de phénotypes n'apparaissent pas initialement mais seulement après 1 jour d'incubation. Le groupe majeur B1 reste important durant le stockage et constitue la population dominante. Le groupe B1 décroît dans l'eau de l'émergence, un jour après l'embouteillage, avant une nouvelle recroissance, alors que dans le même temps, il augmente dans les bouteilles prélevées sur la chaîne. Ceci est facilement expliqué si B1 était une souche viable cultivable allochtone majeure implantée dans la chaîne d'embouteillage.

Le groupe J représente la seconde population dominante mais montre de larges fluctuations. B2 est relativement abondant durant la première semaine d'incubation. Ensuite, il disparaît mais montre des revivifications dans le temps. B2 est vraisemblablement un composant important de la population viable non cultivable.

Discussion

Il existe des différences au sujet de l'évolution des populations microbiennes, selon le point de prélèvement. Si une croissance bactérienne apparaît rapidement après l'embouteillage, ce qui a été décrit à maintes reprises (Schmidt-Lorenz 1976; Leclerc *et al.* 1985; Morais et Da Costa 1990), l'évolution des différentes sous-populations (viables cultivables, viables non cultivables et mortes) varie.

Si l'embouteillage est manuel à l'émergence, le nombre de micro-organismes est très faible. Comme l'eau minérale constitue un environnement oligotrophique, le carbone organique dissout est à peine suffisant pour une croissance bactérienne atteignant une population d'environ 10^5 UFC/ml. Cette prolifération existe pendant quelques jours, puis une large proportion des cellules entre dans un état viable mais non cultivable. Durant un stockage prolongé, les sous-populations restent relativement stables. La cultivabilité cellulaire ne décroît pas comme dans le cas du modèle *Vibrio vulnificus* (Oliver 1995), en revanche les cellules viables restent à un haut niveau comme dans le modèle de survie au jeûne, décrit pour le genre *Pseudomonas* (Cabral 1995; Clegg *et al.* 1996). L'identification des phénotypes

obtenus sur R2A confirme cette appartenance à la famille des bacilles à Gram négatif oxydase positive.

L'eau est grandement enrichie en bactéries lors de son transit à travers les filtres et les canalisations de la chaîne d'embouteillage. Mais ces sous-populations sont immédiatement bouleversées, avec une importante décroissance suivie d'une augmentation conséquente. Ceci peut être corrélé avec l'adaptation ou le manque d'adaptation des bactéries au stress relatif à l'embouteillage. En effet, la diversité microbienne est limitée après stockage, seules les populations majeures ne sont pas affectées.

V.5/ Etude des effets d'un stockage prolongé (2 à 3 ans) sur la population bactérienne totale, viable, viable cultivable, viable non cultivable et morte dans des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye

Le Tableau 28 illustrent l'évolution des populations des eaux minérales de la Source du Clos de l'Abbaye stockées 709 (Octobre 1995) à 969 jours (Janvier 1995).

La population viable totale oscille entre 10^4 et 10^5 bactéries/ml. Une relative stabilité de cette population est observée malgré un long stockage. La population viable non cultivable est également relativement stable et représente 90% de la microflore viable totale.

Quant à la population viable et cultivable, son effectif ne représente qu'approximativement 10% de la population bactérienne viable et montre parfois selon les bouteilles, d'importantes variations (de 1 à 3 log). La population viable représente 90% de la microflore totale et indique une relative stabilité. Au contraire, la population des bactéries mortes est faible (10%) et subit des variations pouvant atteindre 1 log.

Neuf phénotypes sur le milieu R2A sont observés à partir de cette population et désignés par un nombre :

- colonies blanches, bombées, opaque, 4mm (1)
- colonies jaunes orangées, opaques, 2mm (2)
- colonies jaunes-crèmes, translucides, 3mm (3)
- colonies blanches, translucides (4)
- colonies marrons (5)
- colonies oranges foncées (6)
- colonies jaunes, translucides, visqueuses, à bords irréguliers (7)
- colonies jaunes, opaques, 1mm (8)
- colonies roses, opaques, 1mm (9)

Tableau 28 : Dénombrement des cellules totales, viables, viables cultivables, viables non cultivables et mortes dans les eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye après 2 à 3 ans de stockage.

Age des bouteilles (jours)	Dénombrement de				
	Bactérie totale 10^4 ml^{-1}	Bactérie viable [†] 10^4 ml^{-1}	Bactérie cultivable [§] 10^3 ml^{-1}	Bactérie VNC 10^4 ml^{-1}	Bactérie morte [‡] 10^4 ml^{-1}
709	9,1 ± 2,1 [§]	6,2 ± 1,8	7,36	6,0	2,4 ± 0,8
710	6,7 ± 1,6	2,2 ± 1,5	4,31	1,8	4,4 ± 1,4
711	5,8 ± 1,6	3,6 ± 1,4	3,83	3,2	2,2 ± 0,8
715	7,5 ± 1,6	2,0 ± 1,5	3,40	1,7	5,7 ± 1,9
716	5,0 ± 2,0	4,6 ± 1,8	3,79	4,2	0,3 ± 0,3
717	4,8 ± 1,9	3,4 ± 1,6	2,20	3,2	1,3 ± 0,4
718	7,1 ± 2,2	5,7 ± 1,8	3,34	5,4	1,4 ± 0,5
722	6,4 ± 1,9	3,0 ± 2,0	4,03	2,6	3,3 ± 0,6
723	5,8 ± 1,1	2,9 ± 0,8	3,59	2,5	2,8 ± 0,7
724	6,6 ± 1,1	6,3 ± 1,1	2,89	6,0	0,3 ± 0,3
725	6,3 ± 2,1	5,4 ± 1,9	6,34	4,8	0,7 ± 0,4
729	4,1 ± 1,0	2,7 ± 0,5	3,37	2,4	1,4 ± 0,9
730	5,0 ± 1,6	2,8 ± 1,0	2,72	2,5	2,2 ± 0,9
731	6,2 ± 1,8	3,1 ± 1,1	2,70	2,8	3,2 ± 1,1
732	5,7 ± 1,3	2,3 ± 0,9	1,32	2,2	3,4 ± 0,7
736	6,6 ± 1,6	4,1 ± 2,8	6,16	3,5	4,9 ± 1,4
737	4,3 ± 1,1	4,3 ± 2,7	9,58	3,3	2,5 ± 1,1
738	6,4 ± 1,3	4,2 ± 1,4	1,06	2,9	2,2 ± 0,7
759	7,6 ± 2,6	7,1 ± 2,5	2,90	6,8	0,6 ± 0,6
836	2,8 ± 1,0	2,9 ± 1,0	3,70	2,5	0,4 ± 0,3
838	4,8 ± 1,4	4,2 ± 1,3	3,20	3,9	0,6 ± 0,4
840	3,4 ± 0,8	3,0 ± 0,8	1,50	2,9	0,4 ± 0,3
843	7,6 ± 2,2	7,2 ± 2,1	2,80	6,9	0,3 ± 0,2
844	2,9 ± 1,1	2,5 ± 1,0	1,30	2,4	0,3 ± 0,2
846	1,0 ± 3,8	9,7 ± 3,4	*	9,7	0,6 ± 0,6
847	9,5 ± 2,1	8,2 ± 2,3	*	8,2	1,3 ± 0,5
851	8,9 ± 2,1	7,6 ± 1,9	4,40	7,2	1,2 ± 0,6
852	6,8 ± 1,5	6,1 ± 1,5	0,03	6,1	0,6 ± 0,2
860	1,0 ± 3,7	1,0 ± 3,2	*	1,1	1,1 ± 0,6
861	5,8 ± 3,1	5,3 ± 3,0	3,8	4,9	0,5 ± 0,3
865	1,0 ± 4,9	9,7 ± 4,5	2,7	9,4	1,6 ± 0,8
866	6,4 ± 2,7	4,9 ± 2,3	5,7	4,3	1,0 ± 0,8
867	6,4 ± 2,5	5,9 ± 2,4	0,6	5,9	0,5 ± 0,3
868	5,3 ± 2,1	4,6 ± 2,0	*	4,6	0,7 ± 0,4
869	4,2 ± 2,0	3,4 ± 1,6	0,98	3,3	0,8 ± 0,6
872	3,7 ± 2,2	3,3 ± 1,9	*	3,3	0,5 ± 0,3
873	2,7 ± 1,5	1,9 ± 0,6	0,01	1,9	0,5 ± 0,5
874	3,4 ± 1,7	3,1 ± 1,5	1,80	2,9	0,3 ± 0,2
875	3,2 ± 1,4	2,8 ± 1,2	*	2,8	0,4 ± 0,2
879	1,7 ± 1,0	1,5 ± 1,0	0,38	1,5	0,2 ± 0,2
880	3,1 ± 1,5	2,8 ± 1,4	0,18	2,8	0,3 ± 0,2
883	3,9 ± 1,2	3,5 ± 1,2	1,80	3,3	0,4 ± 0,2
884	6,6 ± 1,2	5,9 ± 1,1	3,40	5,6	0,7 ± 0,3
885	6,4 ± 1,6	5,6 ± 1,5	2,40	5,4	0,8 ± 0,6
888	8,5 ± 1,7	7,6 ± 1,8	2,60	7,3	1,0 ± 0,4
889	5,4 ± 1,2	3,5 ± 1,0	2,00	3,3	1,9 ± 0,5
891	4,1 ± 1,4	3,7 ± 1,4	2,40	3,5	0,4 ± 0,2

Peut-être que rien n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela. 175
Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

892	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,3	5,00	0,4	0,2 ± 0,02
895	5,8 ± 1,4	5,2 ± 1,5	3,60	4,8	0,6 ± 0,4
896	5,3 ± 1,1	4,7 ± 1,2	1,70	4,5	0,6 ± 0,2
897	4,0 ± 1,4	3,6 ± 1,4	2,20	3,4	0,4 ± 0,3
898	5,4 ± 1,0	4,9 ± 1,1	2,80	4,6	0,3 ± 0,3
903	6,8 ± 3,0	6,4 ± 3,0	5,40	5,9	0,4 ± 0,3
904	6,8 ± 1,6	5,6 ± 2,1	2,70	5,3	0,4 ± 0,1
905	8,5 ± 1,8	7,9 ± 1,8	2,70	7,6	0,6 ± 3,4
915	1,5 ± 0,6	1,2 ± 0,5	3,20	0,9	0,4 ± 0,3
929	2,6 ± 0,9	1,5 ± 0,6	0,63	1,4	1,1 ± 0,6
930	6,5 ± 2,2	4,0 ± 1,7	1,08	3,9	2,5 ± 0,8
931	1,5 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,42	1,0	0,4 ± 0,3
932	3,5 ± 1,0	2,4 ± 0,8	2,28	2,2	4,9 ± 0,4
936	3,6 ± 0,9	1,1 ± 0,5	0,41	1,1	2,5 ± 0,6
937	3,1 ± 1,5	2,1 ± 1,2	0,57	2,0	0,9 ± 0,7
938	3,4 ± 0,8	1,8 ± 0,7	0,21	1,8	1,6 ± 0,5
941	3,4 ± 0,8	2,7 ± 0,7	1,12	2,6	0,8 ± 0,3
945	3,4 ± 1,0	2,6 ± 1,0	0,38	2,6	0,8 ± 0,3
946	4,0 ± 1,9	1,7 ± 1,5	1,24	1,6	2,2 ± 1,0
947	3,7 ± 1,8	1,8 ± 1,1	0,23	1,8	1,9 ± 1,1
948	6,7 ± 1,1	3,0 ± 1,2	0,23	3,0	3,6 ± 0,9
953	2,4 ± 0,9	1,7 ± 0,6	0,93	1,6	0,7 ± 0,7
954	5,0 ± 1,4	3,3 ± 1,1	4,63	2,8	1,6 ± 0,4
955	2,2 ± 0,7	1,5 ± 0,7	1,08	1,4	7,4 ± 0,6
956	7,7 ± 2,7	4,0 ± 1,6	0,24	4,0	3,7 ± 1,6
960	3,7 ± 0,9	2,7 ± 0,8	0,08	2,7	9,5 ± 0,6
961	3,8 ± 1,9	9,8 ± 1,4	0,45	9,8	2,4 ± 0,8
962	1,1 ± 0,6	1,3 ± 0,6	2,94	1,0	0,7 ± 0,4
966	3,4 ± 1,0	1,9 ± 0,8	2,36	1,7	1,5 ± 0,6
967	6,3 ± 2,4	5,6 ± 2,4	0,51	5,5	0,8 ± 0,5
968	5,0 ± 1,0	4,6 ± 0,4	5,24	4,1	0,4 ± 0,2
969	5,9 ± 2,1	4,9 ± 1,7	0,57	4,8	1,0 ± 0,4

† dénombrement des cellules vertes après coloration au Live/Dead

‡ dénombrement des cellules rouges après coloration au Live/Dead

§ dénombrement des bactéries cultivables sur gélose R2A

* limite de détection

§ écart type (n=2)

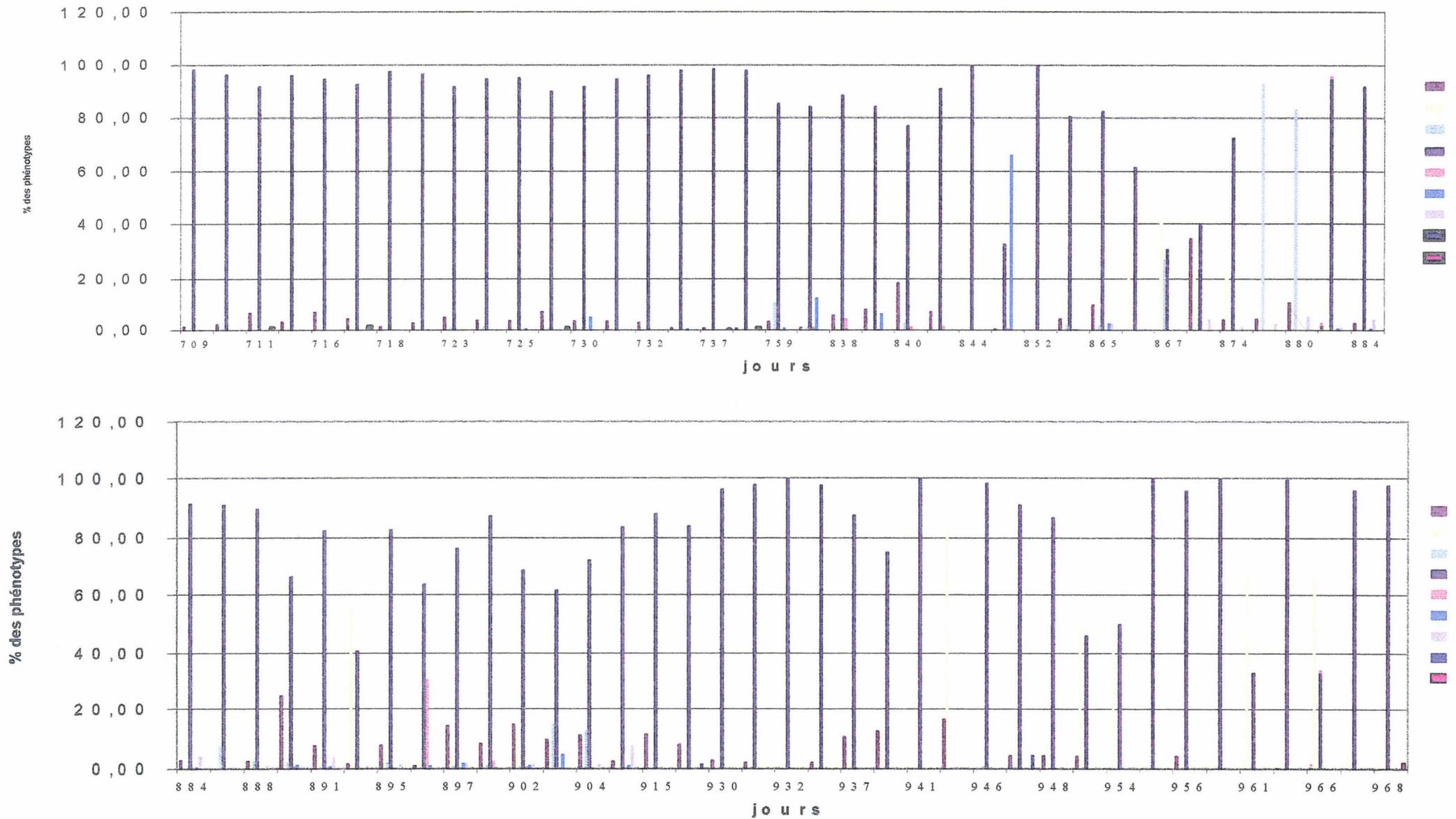


Figure 26 : Evolution de la microflore viable cultivable des eaux embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye âgées de 2 à 3 ans.

Nous remarquons d'importantes variations dans la constitution de la microflore cultivable au sein des bouteilles (Figure 26). Les phénons dominants sont les suivants, (1), (3) et (4). Régulièrement rencontrés, ils apparaissent en revanche avec des valeurs extrêmement variables. Les autres phénotypes, sous-numéraires, sont détectés de manière discontinue et sporadique.

Discussion

En ce qui concerne la nature et la survie de la microflore des eaux minérales naturelles de la Source du Clos de l'Abbaye, la discussion est analogue à la précédente ; seule les phénotypes et leurs fréquences diffèrent avec la population bactérienne de l'eau de la Source Vauban. Pourtant, il est à souligner qu'après une longue période de stockage, la population totale et viable restent relativement stable par rapport à celle de la source Vauban.

Malgré la rationalisation de l'embouteillage, la microflore varie d'une bouteille à l'autre, d'un jour à l'autre. Les perturbations lors de l'échantillonnage peuvent donc générer des conditions d'enrichissement pour les micro-organismes. Par exemple, les fluctuations de la température, détachement de cellules, désagrégation de cellules, mélanges physiques de gaz, d'eau, de nutriments ou d'ions peuvent jouer des rôles importants en fournissant des conditions adéquates de croissance et de résurrection ou à l'inverse en produisant des effets létaux pour des populations microbiennes spécifiques (Haldeman *et al.* 1995).

V.6/ Effet de l'ajout de peptone sur les différentes sous-populations bactériennes des eaux minérales embouteillées de la Source du Clos de l'Abbaye

Nous suivons les différentes populations pendant 56 heures, après l'ajout de peptone dans les bouteilles. L'analyse est réitérée et les résultats sont illustrés par les Figures 27 et 27'. La synthèse des dénombrements des cellules viables cultivables et des cellules viables non cultivables ainsi que du suivi des phénotypes permet d'observer une multiplication, une revivification, une transformation et une disparition de micro-organismes, après l'ajout de peptone aux eaux minérales oligotrophes.

Discussion

Dans une population bactérienne âgée, en survie, il existe une multitude de types physiologiques et de morphologies rendant compte de leurs statuts présents, de leurs états antérieurs et de leurs adaptations futures.

Résultats et Discussions

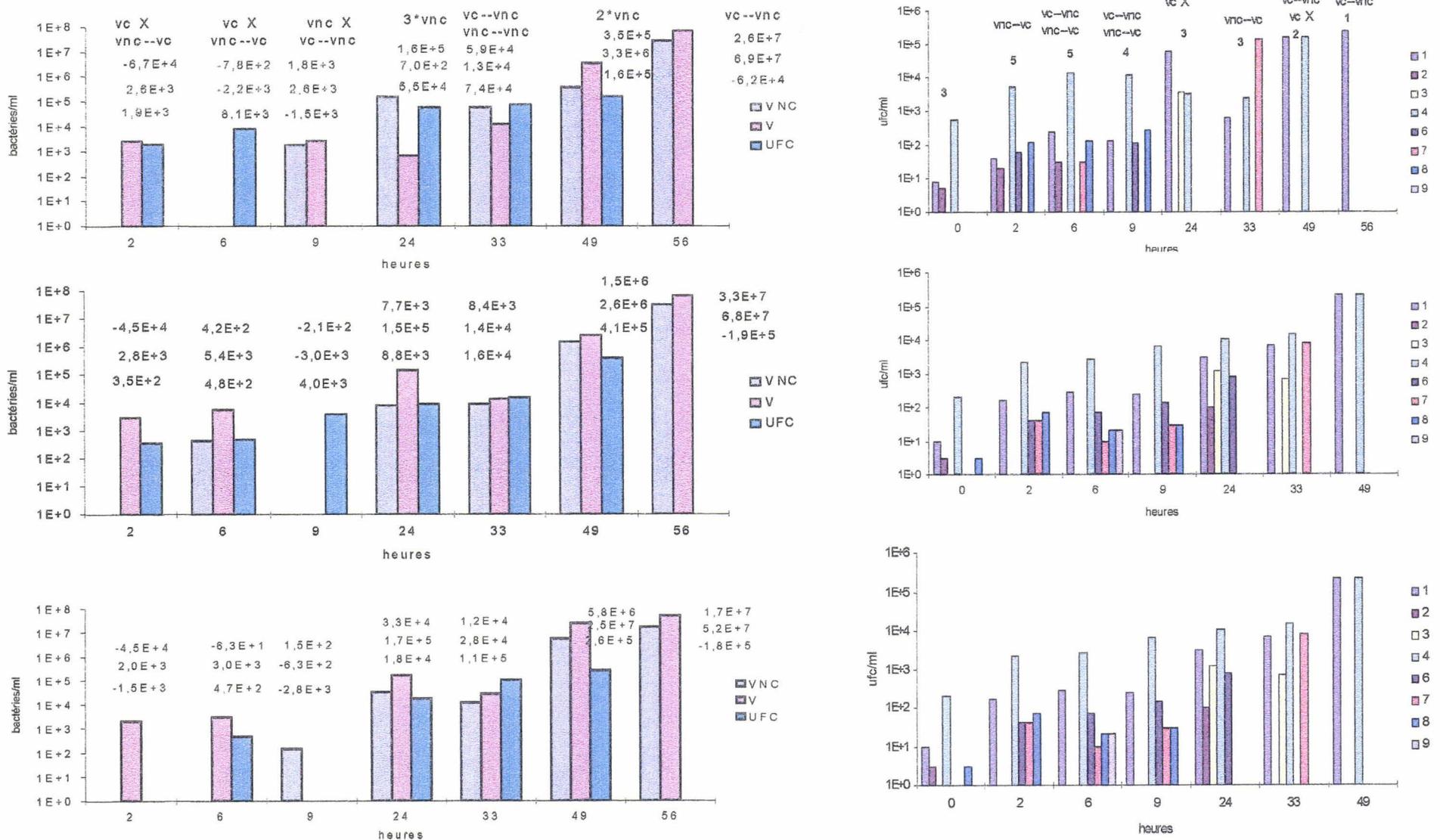


Figure 27: Evolution des différentes populations (viable cultivable, viable non cultivable, viables totale) et des phénotypes rencontrés dans les eaux embouteillées âgées d'environ deux ans, et additionnées de peptones.

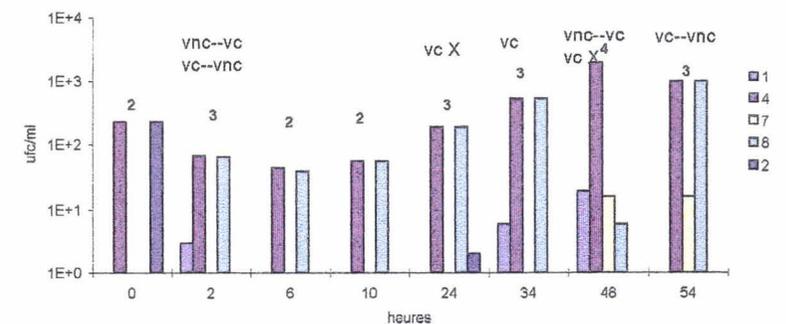
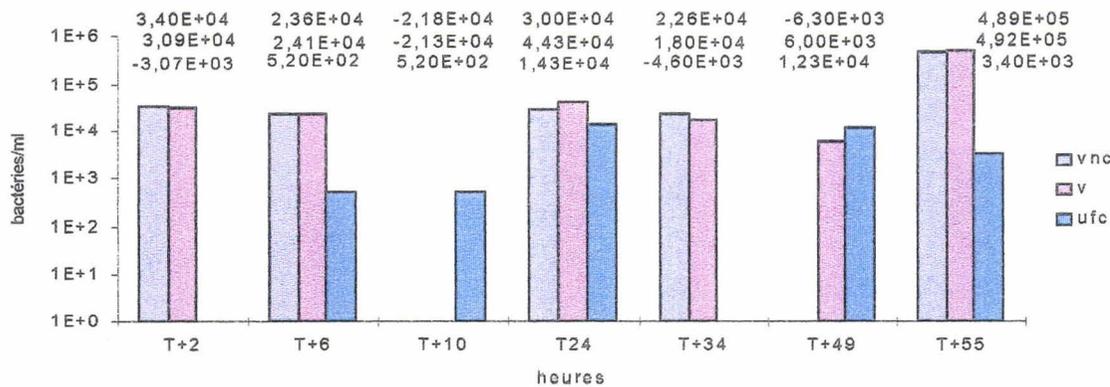
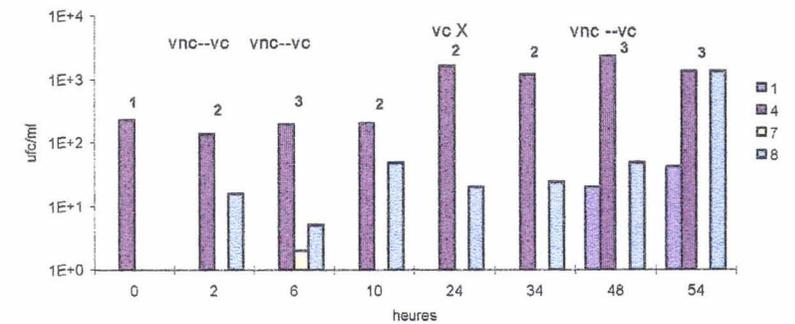
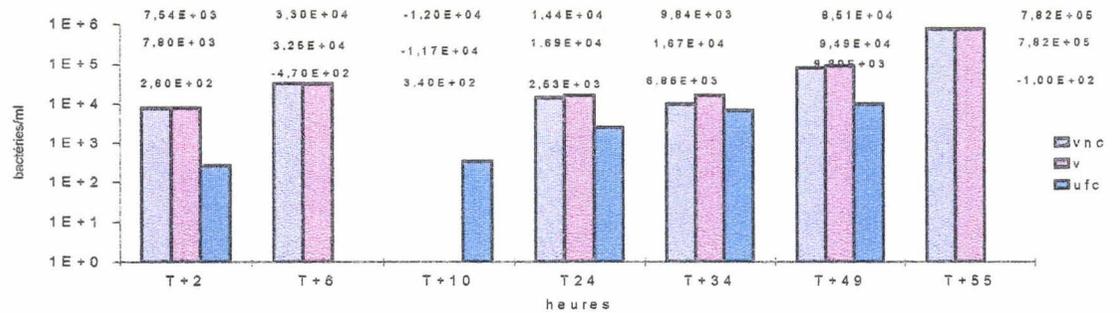
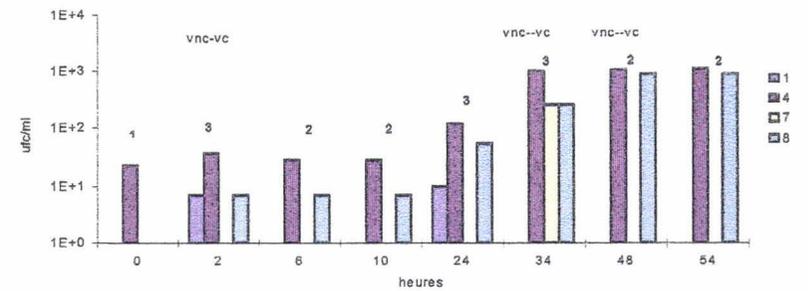
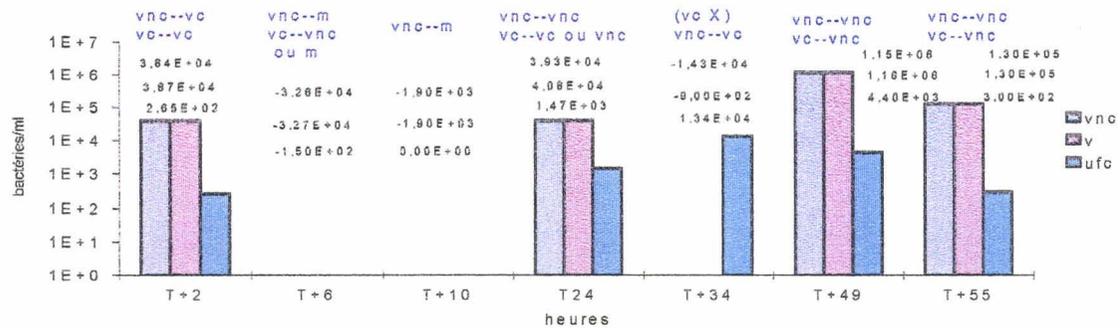


Figure 27': Evolution des différentes populations (viable cultivable, viable non cultivable, viables totale) et des phénotypes rencontrées dans les eaux embouteillées âgées d'environ deux ans, et additionnées de peptones.

L'ajout de peptone dans notre étude a par conséquent un impact plus ou moins rapide, plus ou moins important, plus ou moins durable sur tels ou tels micro-organismes de telles ou telles sous-populations. D'autant plus que certains auteurs suggèrent même l'existence de plusieurs sous-populations dans un même état, tel que viable mais non cultivable (Mc Dougal *et al.* 1998). Yamamoto *et al.* (1996) décrivent différentes phases intermédiaires durant la transition vie/mort, qui expliquent également les différents comportements cellulaires rencontrés au cours du temps et lors d'un rétablissement de conditions de croissance. Les cellules exposées à un stress (jeûne nutritif, facteurs physico-chimiques létaux) montrent avant tout un état viable non cultivable. Dans cette phase, les cellules peuvent restaurer leur capacité à se multiplier après un processus de revivification. Au cours de la seconde phase, une partie des composants cellulaires se dégradent progressivement. Les bactéries viables non cultivables peuvent alors avoir une réponse métabolique après administration de nutriments mais sont incapables de restaurer leur cultivabilité. Dans la troisième étape, seulement les composants cellulaires durables tels que la membrane cellulaire externe, des enzymes et l'ADN résistent aux effets des facteurs ambiants.

V.7/ Conclusion

La microflore cultivable sur gélose PCA des eaux embouteillées se multiplie dans un premier temps, pour décroître de façon appréciable dès le premier mois. Mais cette évolution dépend grandement du mode opératoire. Ainsi, le milieu R2A met en évidence une plus grande population maximale et une stabilité de cette concentration cellulaire, même après trois mois. Les conditions opératoires (température et temps d'incubation des boîtes de Pétri) et le temps d'entreposage des bouteilles influent sur la cultivabilité des micro-organismes des eaux minérales. La cultivabilité varie également selon les caractères physico-chimiques de l'eau et la nature des bactéries.

Lors des études comparatives sur les milieux, nous constatons que :

- *la quantité de matière trop importante a bien un effet inhibiteur sur la cultivabilité de certains micro-organismes. Il est vraisemblablement dû aux importantes différences entre les conditions environnementales et celles de laboratoire, et donc par conséquent à une inadaptation métabolique et physiologique.*
- *la qualité des nutriments est un facteur important dans la cultivabilité de la microflore bactérienne. Cette constatation est soulignée avec des milieux*

*Peut-être que n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela.
Eduard Douwes Dekker (1820-1887)*

gélés aux concentrations nutritives adéquates pour ces micro-organismes. La valeur relative à la nature des nutriments s'avère ici supérieure à celle de leur concentration.

- *chaque niche possède une microflore aux exigences diverses, impliquant des conditions de culture variées.*
- *une simple investigation de la microflore cultivable reste un paramètre fiable et robuste pour la caractérisation rapide et la différenciation (phénotypie, physiologie, adaptation...) entre les populations de diverses niches écologiques (eaux de griffon, eaux embouteillées).*

L'augmentation de la population microbienne dans les eaux minérales après embouteillage est expliquée par un changement drastique de la composition du produit fini. Nous testons quelques facteurs incriminés dans cette évolution. Nous concluons alors que :

- *l'oxygénation de l'eau lors de l'embouteillage n'est pas impliquée dans la croissance bactérienne post-embouteillage.*
- *Le carbone organique et l'azote minérale ne constituent pas les facteurs limitant de cet écosystème, empêchant une plus importante multiplication de la microflore viable cultivable.*
- *la présence de molécules d'acides aminés représente le facteur limitant pour l'évolution de la population microbienne des eaux minérales.*

De plus, en accord avec Ferreira et al. (1996) qui ont étudié une eau minérale embouteillée du Portugal, nous concluons que les variations observées au cours des quelques jours après l'embouteillage ne peuvent être interprétées par un trouble dans la microflore des eaux minérales naturelles mais par une stratégie d'adaptation et de survie dans un système fermé et oligotrophe. Pour cela, nos investigations montrent que certaines bactéries adoptent le modèle de survie au jeûne et d'autres deviennent viables mais non cultivables.

Il apparaît difficile de caractériser et de catégoriser les organismes selon leur comportement d'adaptation en fonction de leur identité physiologique ou taxonomique. En effet, il existe vraisemblablement une diversité et une asynchronisation des états au sein d'une même souche dans les communautés microbiennes de l'environnement aquatique

VI/ Implication sanitaire de la microflore des eaux minérales

VI.1/ L'effet barrière de la microflore des eaux minérales envers la colonisation de contaminants fécaux

VI.1.1/ Vauban

Dans le cas des eaux embouteillées (1^{ère} étude : 100 UFC/ml d'*Enterococcus faecalis*, évolution de la microflore cultivable sur gélose BEA), la contamination par les *Enterococcus* décroît très rapidement dès le premier jour (chute de 60 à 95% de la population initiale) (Figure 28). Elle devient nulle le 2^{ème} jour pour les eaux filtrées et/ou stérilisées. Pour l'eau minérale témoin, la disparition totale n'est observée qu'au bout d'une semaine, mais dès le 3^{ème} jour la numération ne représente plus qu'1% de la microflore initiale.

Pour les eaux provenant du forage, une décroissance est également observée. Après quatre jours, la microflore entérococcale viable et cultivable n'est plus décelée.

Dans la seconde expérience (1000 UFC/ml d'*Enterococcus faecalis*, évolution de la microflore cultivable sur BEA, de la flore totale et viable par le Live/Dead), la population viable cultivable entérococcale disparaît en 8 à 9 jours dans les eaux Vauban (Figure 29).

La population viable dans les eaux filtrées et stérilisées montre une décroissance de 2 log en 10 jours d'incubation (Figure 30). Nous observons les mêmes résultats pour les autres eaux

VI.1.2/ Source du Clos de l'Abbaye

Avec les eaux embouteillées de SDCA, la microflore contaminante baisse au cours du temps. Pour chacune d'elle, la diminution est de 50% à 70% de la population initiale après trois jours. Il faut attendre le 6^{ème} jour pour atteindre des valeurs inférieures à 10% de la contamination initiale. Au huitième jour, plus aucune cellule viable cultivable d'*Enterococcus faecalis* n'est observée (Figure 31).

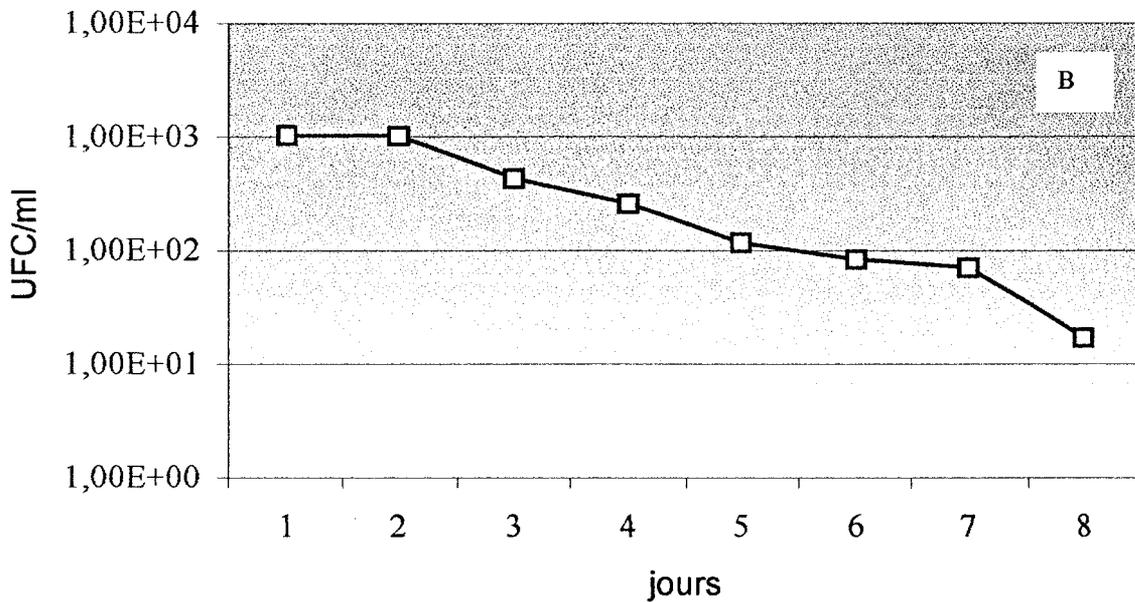
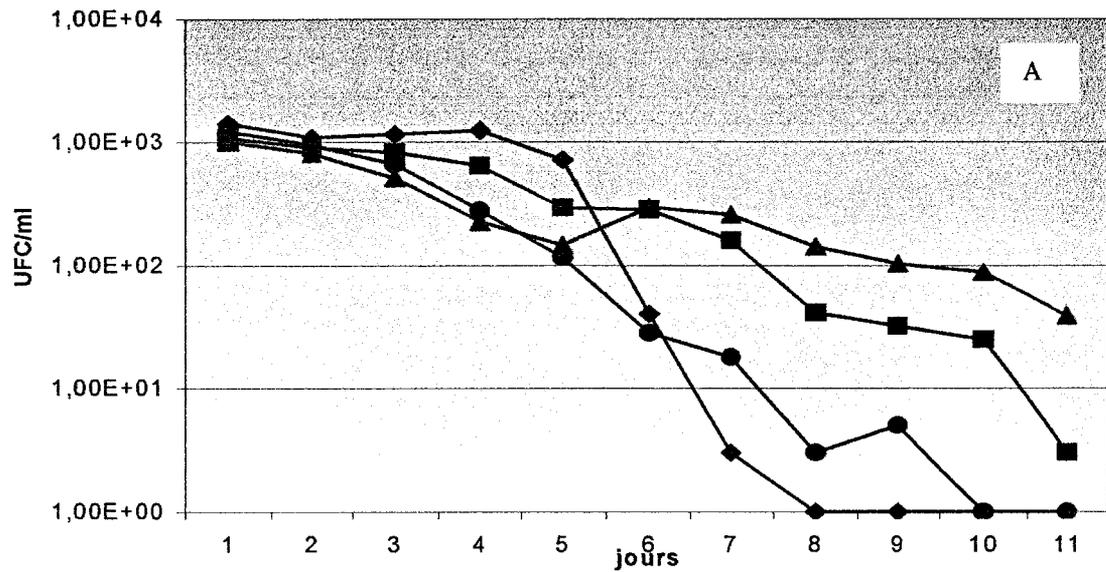


Figure 29 : Evolution de la flore entérococcale ; (A) dans les eaux embouteillées Vauban, (■) eau embouteillée filtrée, (●) eau embouteillée filtrée et stérilisée, (◆) eau embouteillée ; (B) dans les eaux de forage Vauban.

Ces résultats représentent la moyenne de trois à cinq échantillons avec un écart type inférieur à 5% de valeur expérimentale.

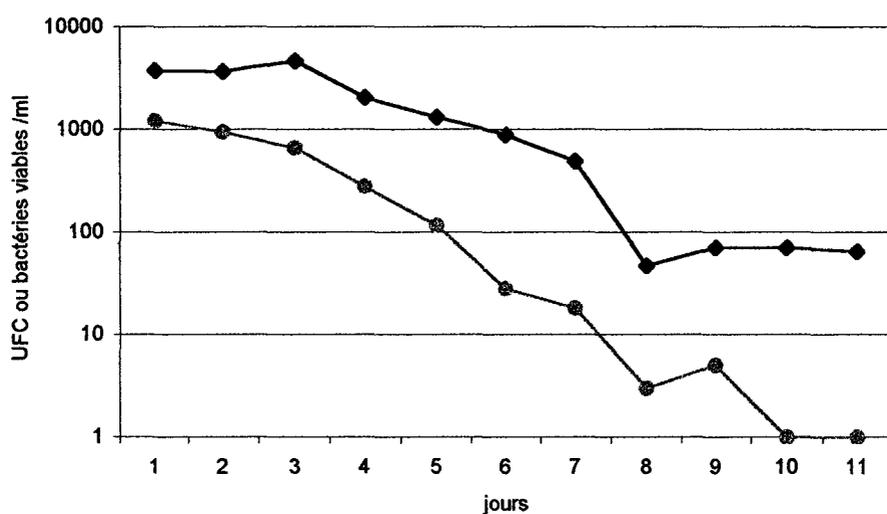


Figure 30 : Evolution de la microflore entérococcale viable totale (◆) et viable cultivable (●) dans les eaux embouteillées filtrées et stérilisées de Vauban.

Ces résultats représentent la moyenne de trois à cinq échantillons avec un écart type inférieure à 5%.

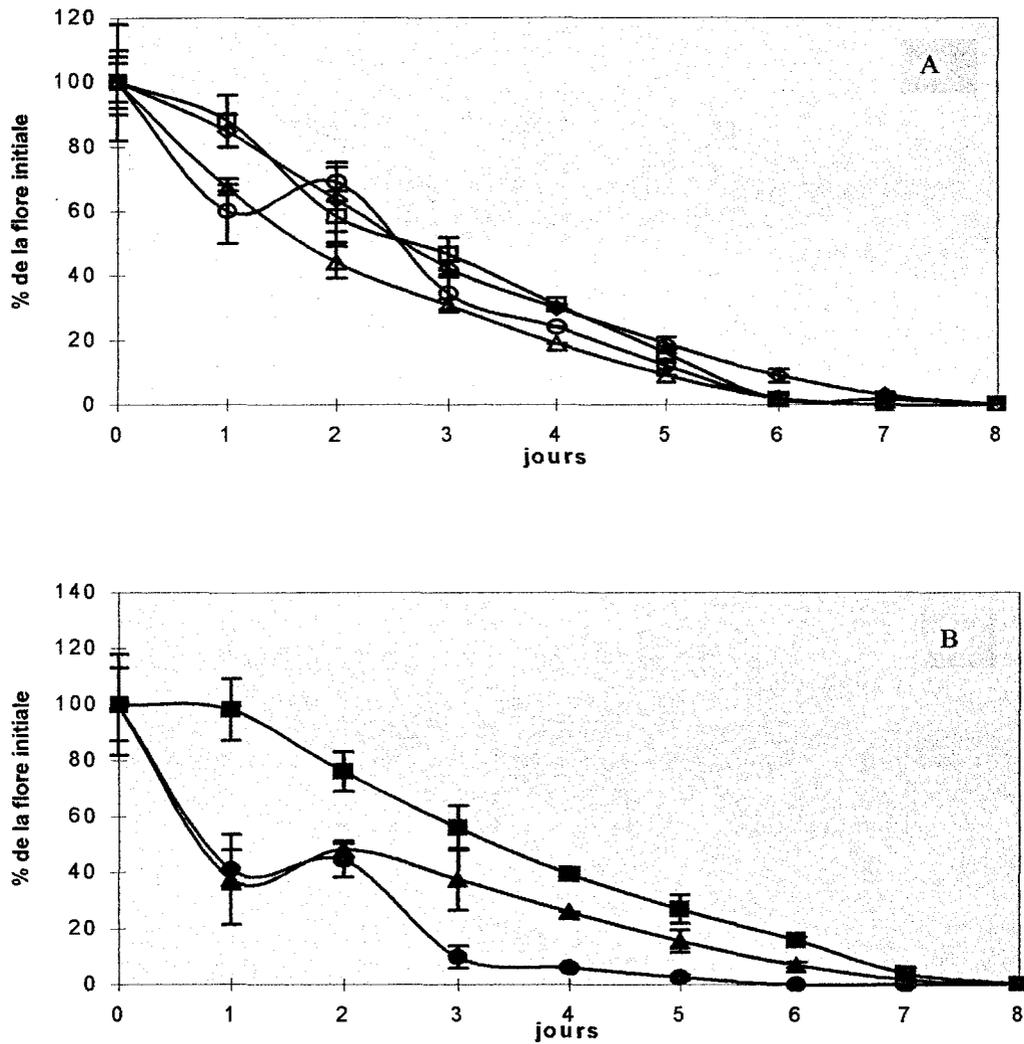


Figure 31 : Evolution de la flore entérococcale ; (A) dans les eaux embouteillées SDCA, (□) eau embouteillée, (◇) eau embouteillée filtrée, (◊) eau embouteillée stérilisée, (○) eau embouteillée filtrée et stérilisée ; (B) dans les eaux de forage SDCA, (▲) eau de forage, (■) eau de forage filtrée, (●) eau de forage filtrée et stérilisée.

Les barres correspondent à l'écart type (n=3)

Dans les eaux de forage, la décroissance de la microflore contaminante représente 10% de la population initiale après trois jours et devient nulle au sixième jour. Il reste 60 à 40% des *Enterococcus* dans les eaux filtrées et natives respectivement après trois jours. Ensuite elles évoluent de façon similaire pour disparaître totalement au huitième jour.

VI.1.3/ Revivification

Après la disparition totale de la microflore entérocoque sous la forme viable cultivable, l'ajout de peptone et de glucose est réalisé. La numération d'*Enterococcus faecalis* effectuée moins de 24 heures après, révèle une population importante de l'ordre d'une centaine par millilitre d'eau additionnée d'une solution peptonée. Le dénombrement après trois jours donne des résultats nettement supérieurs. Nous obtenons les mêmes résultats sur des bouteilles contaminées, après 15 jours d'incubation.

L'apport de glucose s'avère inefficace pour une reviviscence de ces bactéries dans de telles conditions. Aucun organisme n'est isolé sur BEA après 24 ou 72 heures d'incubation des bouteilles supplées.

Les remarques sont les mêmes quelque soit l'eau étudiée: forage, chaîne d'embouteillage, Vauban, SDCA, filtrée et/ou stérilisée.

VI.1.4/ Discussion

Les données de la littérature sur la survie de bactéries en eau superficielle ne peuvent pas être extrapolées aux eaux minérales embouteillées cependant plusieurs auteurs qui étudient la survie des bactéries reconnaissent l'impact du stress d'embouteillage sur les dynamiques de population de ces bactéries (Flint 1987; Barcina *et al.* 1990; Overbeek *et al.* 1990; Korhonen et Martikainen 1991).

Le jeûne initial des organismes tests permet de carencer les bactéries de nutriments rapportés et de minimiser la possibilité de recroissance sous les conditions expérimentales. C'est pourquoi, nous choisissons de travailler avec une culture d'*Enterococcus faecalis* en début de phase stationnaire; l'inoculum est centrifugé puis lavé.

En effet, Gauthier *et al.* (1992) montrent que la sensibilité d'*E. coli* dans l'eau de mer varie considérablement selon les différentes phases de croissance. Cette sensibilité augmente considérablement durant la phase de latence, décroît lors de la phase exponentielle et devient minimale au cours de la phase stationnaire. C'est au niveau de cette phase que la bactérie possède un pool enzymatique maximal et serait alors capable de mieux survivre en adoptant

une stratégie autarcique sans synthèse *de novo*. De plus, Lucas et Ducluzeau (1990) montre également dans l'eau minérale une sensibilité bactérienne qui est fonction de l'âge de culture d'*Escherichia coli*. Une autre étude montre une résistance accrue dans la survie de *Klebsiella pneumoniae* dans l'eau (Lechevallier *et al.* 1988) alors que la culture est en début de phase stationnaire.

La disparition de la population entérococcale est observée dans toutes nos expériences. Elle ne diffère pas selon les traitements appliqués à l'eau (filtration, autoclavage) mais en revanche, varie en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'eau. En effet, la diminution est plus rapide pour les eaux Vauban que pour celle de la Source du Clos de l'Abbaye. Toutefois, le comportement de la microflore contaminante est similaire pour les eaux du griffon et celles embouteillées.

Or nous savons que la microflore du griffon est différente par sa qualité et sa quantité de celle des eaux embouteillées. Au cours de la chaîne d'embouteillage, les eaux se chargent d'une biomasse endémique (filtres, biofilms, ...). Les compétitions bactériennes devraient s'avérer plus forte vis-à-vis des entérocoques sur les eaux embouteillées que sur les eaux des forages. De plus, les eaux embouteillées sont normalement considérées plus riches en nutriments ce qui devrait favoriser la croissance d'une population adaptée (endémique) ou nécessiteuse (flore contaminante). Cependant, nous n'observons aucune différence en ce qui concerne le devenir d'une contamination entérococcale dans ces deux eaux.

Le contrôle de la qualité microbiologique dépend de la cultivabilité des bactéries sur milieux sélectifs, et non de la détermination de la viabilité par des méthodes directes en microscopie à épifluorescence. L'utilisation de milieux sélectifs a sans doute un effet sur la cultivabilité des micro-organismes tests.

La décroissance brusque des *Enterococcus* cultivables dans l'eau minérale Vauban, peut être attribué comme pour *Pseudomonas aeruginosa* ou *Klebsiella pneumoniae*, a un besoin de temps d'adaptation physiologique aux conditions de stress (Roszak et Colwell 1987; Matin *et al.* 1989 ; Moreira *et al.* 1994); le taux de mortalité diminue ensuite.

La disparition des *Enterococcus* cultivables dans les eaux de la Source du Clos de l'Abbaye est plus progressive que celle observée dans les eaux Vauban. Nous savons que la microflore des deux eaux est différente. Entre autre, la biomasse est plus élevée et l'apparition de cellules viables cultivables est plus rapide dans l'eau de la source Vauban.

Cette disparité est peut être propre à la nature de l'eau et/ou de la flore. Lors des expériences de Vess *et al.* (1993), les différents micro-organismes testés donnent des taux de mortalité plus bas dans l'eau du robinet que dans l'eau minérale. Ces résultats sont hypothétiquement attribués, soit aux différentes compositions chimiques, soit aux contenus carbonés des eaux.

Cette même disparité peut être également rapprochée des matériaux de conditionnement. En effet, Vess *et al.* (1993) montrent que le type de container n'influence pas la capacité de survie des entérobactéries testées, mais que *Pseudomonas* a une plus faible mortalité dans l'eau embouteillée en PVC, ce qui reflète la capacité de ces bactéries à coloniser ce type de matériau. Il est également montré que la colonisation des surfaces améliore la capacité des bactéries à résister aux jeûnes et à la désinfection (Lechevallier *et al.*, 1988; Geesey et White, 1990).

Dans les trois eaux traitées (filtration, autoclavage) de la source Vauban, la population bactérienne observée résulte de la contamination entérococcale. Des cellules viables non cultivables sont alors retrouvées chez *E. faecalis* dans nos eaux minérales et leur population varie lors de l'incubation.

La taille de l'inoculum n'a aucune incidence sur l'évolution d'*E. faecalis* au sein des eaux. La perte de cultivabilité ainsi qu'une importante mort cellulaire sont observées dans tous les cas.

Pour ce qui concerne la revivification éventuelle de cellules VNC, il est difficile de savoir si l'ajout de peptones a permis la croissance de germes dormants survivants, ou un changement de l'état de cultivabilité suivi de la croissance d'une population existante et inadaptée aux conditions particulières des eaux minérales étudiées.

La seconde hypothèse semble plus crédible quant à l'évolution du nombre de cellules viables cultivables sur 24 heures, et selon nos connaissances sur les contaminations fécales dans un milieu oligotrophe (stress, température, adaptation, temps de séjour,...). De plus, Ducluzeau *et al.* (1976b) montrent que la présence dans l'eau minérale d'une source de facteurs de croissance (extraits de levure) permet de prolonger la survie de *Enterococcus faecalis* dans l'eau minérale. Les résultats relatifs à la viabilité confirment ces hypothèses par la présence de cellules viables non cultivables (viables non cultivables) capables de ressusciter lors d'apport nutritif (Chmielewski *et al.* 1995).

Les entérocoques capables d'utiliser le glucose comme source de carbone ne retrouvent pas comme avec les peptones, leur capacité à se multiplier et/ou leur caractère de cultivabilité

dans nos expériences. Cette observation appuie l'idée d'un facteur de croissance contenu dans la solution peptonnée, qui pallierait la perte de cultivabilité des micro-organismes des eaux minérales et/ou permettrait leur croissance.

Un nombre limité d'études sur la survie des micro-organismes indicateurs et pathogènes dans l'eau minérale montre des désaccords marqués, probablement dus aux différentes conditions des tests et aux multiples caractères chimiques et microbiologiques des eaux minérales étudiées.

Quelles que soient les études antérieures, une décroissance générale dans la cultivabilité des micro-organismes tests est observée dans les eaux (Moreira *et al.* 1994; Ducluzeau *et al.* 1976, 1977; Karajina et Gonul 1991). Celle-ci est plus ou moins prononcée. Leur survie peut parfois être améliorée par l'addition de matières organiques (matières fécales, extrait de levure). Deux hypothèses sont mises en avant pour expliquer le mécanisme de l'activité antagoniste exercée par la flore autochtone sur des micro-organismes tests : (i) soit la microflore des eaux embouteillées entrent en compétition avec la population entéroccoccale pour un facteur de croissance (ii) soit la flore produit une substance inhibitrice envers ces bactéries.

Ducluzeau *et al.* (1984) donnent raison à la seconde hypothèse. En effet, ils ne montrent aucune compétition avec un nombre croissant de bactéries autochtones. De plus, l'addition d'une source d'énergie comme le glucose, facilement utilisée par *E. coli*, ainsi que l'augmentation du stockage des bouteilles n'éliminent pas l'effet inhibiteur de l'eau Vittel associée à la flore autochtone. Ils soumettent l'idée d'une production de substances toxiques, qui seraient concentrées dans un système clos et deviendraient toxiques après lyse des cellules et relargage des contenus cytoplasmiques dans l'eau.

Nos résultats concernant l'addition de peptones et de glucose supportent en revanche la première hypothèse. Le facteur de croissance s'avère limitant dans ce système fermé et une compétition entre la flore autochtone adaptée et une contamination, existerait bel et bien dans les cas expérimentaux ci-dessus. La production d'une hypothétique substance inhibitrice par la flore autochtone pourraient être en fait supplanté par l'utilisation par cette flore d'un même facteur de croissance.

Toutefois, quelque soit l'hypothèse retenue, il semble surtout que les micro-organismes tests n'aient pas les capacités d'adaptation à un tel environnement. Ce fait est souligné lors de la comparaison entre la survie des micro-organismes fécaux (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*) qui est moindre, et celle de micro-organismes « mixtes » (humain/environnement) comme

Peut-être que n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela.
Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

Pseudomonas, *Klebsiella* et *Enterobacter*. Ce phénomène est confirmé par le fait que la population entérocoquale est souvent plus faible dans les eaux aseptisées, ce qui relègue la biomasse originelle à un rôle facultatif quant à la disparition de la contamination dans ces eaux.

VI.1.5/ Conclusion

L'espèce Enterococcus faecalis est utilisée comme indicateur de contamination fécale dans le contrôle microbiologique des denrées alimentaires. Bio-marqueur très utile dans les aliments riches en nutriment, il apparaît moins intéressant dans les eaux minérales au regard de son adaptation dans ce milieu oligotrophe et des modes opératoire normalisés requis pour sa recherche.

Les eaux minérales étudiées, Vauban et Source du Clos de l'Abbaye, apparaissent quoiqu'il en soit, protégées par leur composition globale d'une colonisation de micro-organismes indésirables, désignant les produits alimentaires comme insalubres. Cette disparition ne met pourtant pas à l'abri le consommateur si la contamination est conséquente. La microflore est alors sous forme viable non cultivable (VNC), lequel état existe également chez les bactéries pathogènes (Jacobsen et al. 1997; Steinert et al. 1997; Hussong et al. 1987; Rollins et Colwell 1986; Ravel et al. 1995; Chmielewski et Frank 1995). Peu d'études en revanche, permettent de se prononcer sur l'état de virulence de ces bactéries viables non cultivables (Linder et Oliver 1989; Rahman et al. 1996). Il est par conséquent capital d'examiner rapidement la microbiologie des eaux suite à l'embouteillage comme il l'est préconisé dans les textes.

VI.2/ La multirésistance des bactéries des eaux minérales

VI.2.1/ Echantillonnage et dénombrement

Les conditions requises montrent de grandes disparités dans les résultats (Tableau 29) selon le milieu utilisé et les conditions opératoires (température et durée d'incubation) requises. Nous notons que le milieu PCA officiel rend compte d'une population de cellules viables revivifiables aérobies mésophiles totales plus faible que le R2A. Nous remarquons également que la microflore capable de se développer rapidement à 37°C sur ces deux milieux, est très limitée car elle représente moins d'1 à 12% de la microflore rencontrée à 20°C au bout de 3 jours. Nous pouvons également conclure à un taux de croissance moindre pour les bactéries à 37°C voire une inhibition, car nous ne mettons en évidence que 47 à 80% de la population croissant à 20°C dans un même temps d'incubation. Une différence sur la nature des micro-organismes en fonction du griffon existe. La microflore de la source Vauban semble mieux adaptée pour croître à 37°C.

VI.2.2/ Identification

Les bactéries isolées sont tous des bacilles à Gram négatif, ne fermentant pas le glucose. Leur identification présomptive (Tableau 30) par galerie API 20NE rend compte des genres suivants: *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Agrobacterium* et *Moraxella*.

VI.2.3/ Etude de la résistance

Sur les isolats étudiés, la multirésistance est indéniable (Tableau 31). Les pourcentages de résistance oscillent entre 21 et 77% (soit 13 et 48 antibiotiques) des 62 antibiotiques testés. Il existe ainsi une grande disparité entre les profils de résistance. La plus grande résistance (100% des souches) s'observe pour la nitroxoline et la sensibilité la plus marquée (95% des souches) pour l'imipènème.

Les antibiotiques classés par famille donnent d'autres renseignements. Les profils d'antibiogramme rendent toujours compte de fortes distinctions entre les isolats. Les résistances moyennes des isolats liées aux familles d'antibiotiques suivent l'ordre suivant: quinoléine> acide fusidique=nitrofurane> fosfomycine> céphalosporine> macrolide> quinolone> glycopeptide> rifamycine> phénicol> pénicilline> polypeptide> tétracycline> sulfamide> aminoside.

Tableau 31: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des isolats d'eaux minérales

FAMILLES (Nombre d'antibiotiques testés)	SOUCHES																			Résistance totale
	V371	V372	V373f§	V374	V375	V376	V377	V378	V379	V3710	V3711	V3712	V3713	S371	S372f	S373	S374	S375	S376	
Céphalosporine (13)	31	69	92	38	77	46	31	92	100	77	85	100	92	25	85	23	31	100	100	68
Quinolone (7)	100	86	71	100	71	57	86	43	57	29	43	57	67	71	86	43	43	71	71	66
Pénicilline (14)	43	50	86	43	43	36	14	28	28	36	43	93	46	0	71	28	21	50	86	44
Sulfamide (2)	100	0	100	0	0	0	50	0	0	0	0	0	50	0	50	0	0	50	0	21
Macrolide (7)	43	86	100	28	86	14	14	86	100	86	100	86	71	14	100	14	57	100	86	67
Polypeptide (2)	50	0	0	50	0	50	100	0	0	50	50	50	50	50	0	50	100	100	0	39
Tétracycline (3)	0	67	33	0	0	0	0	0	0	0	0	50	66	33	0	33	33	66	66	24
Rifamycine (1)	0	100	100	100	0	0	0	100	100	100	0	100	100	0	100	0	0	0	100	53
Aminoside (7)	43	14	0	14	0	14	14	0	0	0	0	33	17	0	86	0	0	0	0	12
Nitrofurane (1)	0	0	100	100	0	0	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0	100	100	100	68
Phénicol (1)	0	0	100	100	0	0	0	100	100	0	0	nd*	100	0	100	100	0	100	100	50
Quinoléine (1)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Glycopeptide (1)	0	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	74
Acide fusidique (1)	0	100	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	79
Fosfomycine (1)	0	100	100	100	100	0	100	100	100	0	100	100	0	100	100	0	0	100	100	68
Résistance totale	44	50	74	46	50	32	34	52	56	47	53	75	64	21	77	26	32	69	73	54

*nd: non déterminé ; § isolé du forage

Peut-être que n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela.

Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

Les familles d'antibiotique ayant 100% d'efficacité sur les isolats sont rares, hormis les familles au nombre limité d'antibiotique et les aminosides, qui constituent une particularité dans notre étude. Les bactéries appartenant aux genres *Comamonas* et *Acinetobacter* possèdent des résistances plus prononcées lorsqu'ils sont issus des eaux minérales embouteillées Source du Clos de l'Abbaye. Nous observons également une homogénéité dans quatre isolats de Vauban identifiés au genre *Acinetobacter*. Le pourcentage d'antibiotique auquel les souches sont résistantes est compris entre 47 et 56%. Les deux souches issues des griffons font partie des 4 isolats dont la résistance excède 70% des antibiotiques testés.

Une troncature de 9 classes est définie (tableau 30). Ces classes s'articulent autour des profils distinctifs de résistances ou de sensibilités marquées par tels ou tels antibiotiques. Dans notre cas, elles s'établissent généralement sur des critères de résistance, exceptée la classe 4, qui se définit par de nombreuses sensibilités. Les souches d'une même espèce isolée d'une source différente (SDCA et Vauban) se distinguent selon leur profil de résistance. Inversement, les isolats de même identité et de sites communs sont répertoriés dans les mêmes classes.

VI.2.4/ Recherche de plasmides

Sur les 19 isolats, 9 présentent des plasmides (Figure 32). Plusieurs bandes chez une même bactérie illustrent l'existence de plasmides différents ou bien de plasmides aux configurations diverses (CCC – OC – L)). Dans les eaux embouteillées SDCA et Vauban, nous avons observé respectivement 1 et 8 souches dotées d'ADN extrachromosomique. Les deux isolats du griffon en sont exempts.

VI.2.5/ Discussion

Suite à ces résultats, il semble que les multirésistances décrites jusqu'aujourd'hui par différentes études aient été quantifiées par défaut. Les pourcentages obtenus diffèrent très nettement de ceux publiés antérieurement. Les isolats montrent une résistance prononcée aux antibiotiques ainsi qu'une importante disparité dans leur profil. Ces résultats ne ressemblent pas à ceux publiés par Massa *et al.* (1995) et Hunter *et al.* (1990). Pourtant, nous soulignons quelques similitudes, comme une grande sensibilité à l'imipénème et la résistance à de nombreuses céphalosporines. Dans les antibiogrammes de ces micro-organismes, la nature de l'antibiotique apparaît plus importante que la nature de la famille. Le

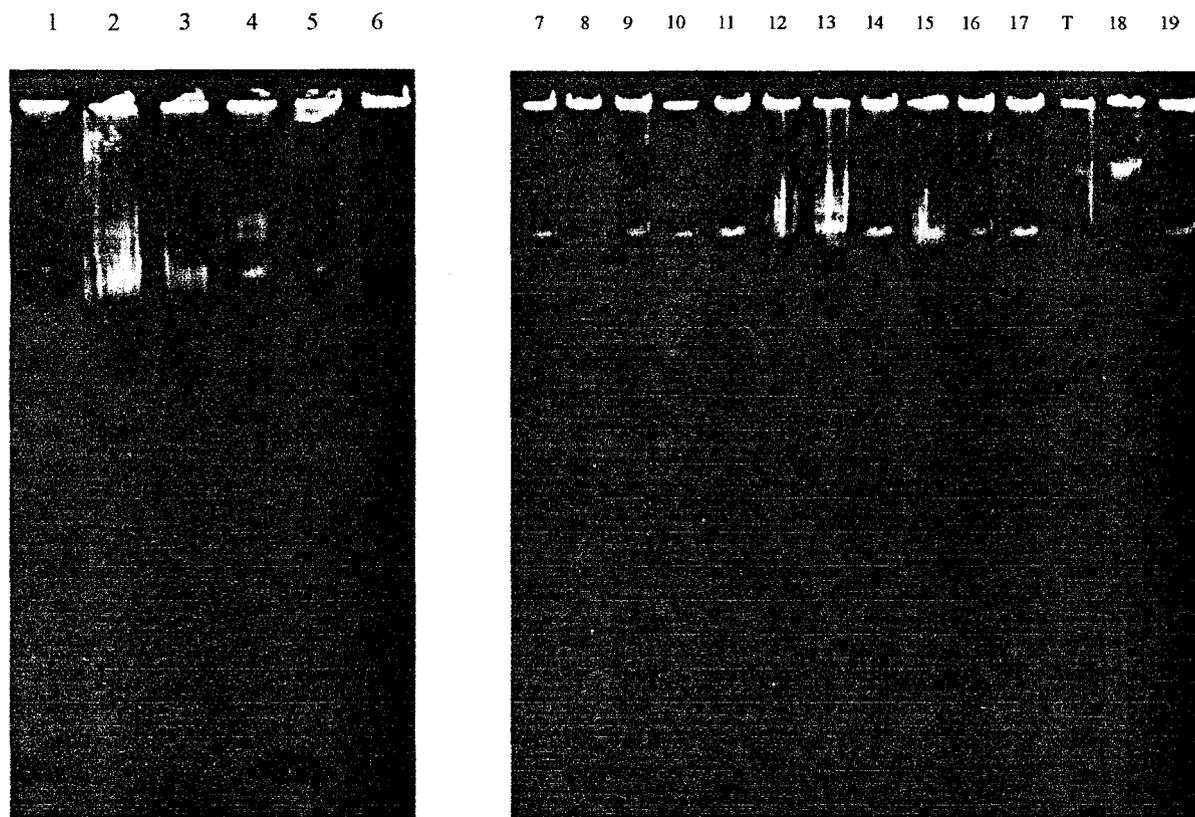


Figure 32 : Recherche d'ADN extrachromosomique après lyse directe des isolats et électrophorèse verticale en gel d'agarose.

mécanisme de résistance semble ne pas s'attacher à l'action générale d'une famille, mais plutôt à la configuration, la conformation, la diffusion de la molécule active.

L'utilisation d'une grande variété d'antibiotiques dans des études taxonomiques permet une meilleure caractérisation. Plusieurs auteurs commentent le lien entre origine et résistance qui pourrait permettre de marquer géographiquement et historiquement les isolats (Zelibor *et al.* 1987 ; Sabry *et al.* 1997). Des différences de sensibilité sont remarquées entre pays dues aux facteurs environnementaux et aux différents profils d'utilisation des antibiotiques concernant les *Acinetobacter* (Obana et Nakai 1991 ; Vila 1993). Armstrong *et al.* (1981) montrent également une multirésistance bactérienne.

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires présentent une résistance naturelle aux antibiotiques suivants: pénicilline G, oxacilline, acide fusidique, vancomycine, aminopenicilline et les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération (Soussy *et al.* 1998). Les isolats identifiés comme des *Comamonas* sp. (V371, V377), *Agrobacterium radiobacter* (S373, S374), *Pseudomonas* sp. (S371) et *Sphingomonas paucimobilis* (V374, V376) présentent des sensibilités paradoxales à l'ensemble de ces antibiotiques. De plus, un comportement intermédiaire (I) est observé vis-à-vis de la pénicilline G pour l'ensemble des isolats (à 2 exceptions de 4 résistants). La totalité des isolats est sensible à l'association amoxicilline + acide clavulanique.

Les *Acinetobacter baumannii* et *Acinetobacter calcoaceticus* possèdent des résistances naturelles aux antibiotiques suivants: pénicilline G, oxacilline, acide fusidique, vancomycine, aminopenicillines, céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération, fosfomycine, furane, lincosamides et streptogramines (Soussy *et al.* 1998). Les isolats V372, V375, V378, V379, V3710, S375 et S376 sont identifiés comme des *Acinetobacter junii*, *lwoffii* et sp. Bien que n'appartenant pas au groupe *baumannii/calcoaceticus*, ils présentent tout le profil de résistance à l'ensemble de ces antibiotiques. A l'exception de l'isolat S375, ils restent sensibles à la colistine.

Le phénotype ticarcilline, ciprofloxacine et aztreonam résistant est un phénomène d'efflux fréquemment rencontré chez *P. fluorescens* isolé d'eau (communication personnelle Dr Izard D.). Ce phénotype n'est que partiellement rencontré chez nos isolats (ticarcilline + aztreonam: 2/19; ciprofloxacine + aztreonam: 2/19; ticarcilline + ciprofloxacine: 0/19). Seul un de nos isolats est identifié comme *P. fluorescens* (phénotype ticarcilline/aztreonam).

Alors que la résistance aux antibiotiques de la microflore des eaux de surface peut partiellement être due à l'action d'actinomycètes et de moisissures qui produisent des antibiotiques (Jones *et al.* 1986), il est plus difficile d'expliquer cette résistance chez les

Peut-être que n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela.

Eduard Douwes Dekker (1820-1887)



bactéries provenant d'eaux profondes telles que les eaux minérales. Même si ces micro-organismes sont issus des sols lessivés par l'eau de pluie et véhiculés lentement (quelques milliers d'années) vers la source, il n'existe aucune explication pour rendre compte d'une résistance croissante en relation étroite avec les utilisations quotidiennes et nouvelles d'antibiotiques (Bergogne-Bérézin et Joly-Guillou 1985; French 1980; Joly-Guillou *et al.* 1988 ; Lambert *et al.* 1988, 1990; Godineau-Gautley *et al.* 1988). Cette observation appuierait le fait que la microflore des eaux embouteillées serait une population endémique au site d'embouteillage et non autochtone du griffon, remarque confirmée par de précédentes études. De plus, un lien entre résistance aux antibiotiques et résistance au chlore est démontré (Murray *et al.* 1984) ainsi que de façon moins certaine à d'autres désinfectants (Al Massar *et al.* 1988). La population *in situ* à la chaîne d'embouteillage s'avère être dans ce cas, car soumise régulièrement à des procédures de nettoyage et de désinfection.

La plupart des micro-organismes que nous isolons appartiennent au même genre ou espèce décrit antérieurement dans d'autres études sur les eaux minérales (Gonzales *et al.* 1987; Manaja *et al.* 1990; Mavridou 1992). Certains sont reconnus comme pathogènes opportunistes et responsables d'infections nosocomiales (Bergogne-Bérézin 1994). Pourtant la consommation d'eau minérale ne peut induire ce type d'infections. En effet, les souches provenant de ces eaux sont rarement capables de croître à 37°C, de surcroît sur un milieu riche et qui plus est, rapidement. De fait, les souches qui sont étudiées pour leur résistances aux antibiotiques ne représentent que 1 à 10% de la flore viable cultivable, selon la source. Ces critères rendent compte d'une colonisation bactérienne peu plausible: température du corps humain, environnement entérique riche en nutriment, compétition bactérienne avec une biomasse au taux de croissance élevé. De plus, sans ces conditions inhibitrices, Ducluzeau *et al.* (1976) montrent l'incapacité d'une telle microflore à s'implanter sur un intestin axénique de souris.

Il est prouvé que les gènes de résistances existent sur les plasmides et qu'ils peuvent être transférables (Young 1993). Dans notre expérience, moins de 50% des isolats possèdent un ou plusieurs plasmides. Seulement une des quatre souches dont la résistance aux antibiotiques excède les 70% est dotée d'un plasmide. En fait, c'est principalement nos isolats *Acinetobacter* qui ont cet ADN extrachromosomique. La résistance aux antibiotiques décrite antérieurement peut également être due, parmi d'autres facteurs, à l'incapacité de l'agent de diffuser dans les cellules (Jones *et al.* 1986), de plus la résistances aux antibiotiques est un phénomène qui a existé bien avant l'utilisation de ces drogues (Anderson *et al.* 1990). Il met en évidence dans de très anciennes cultures lyophilisées (Smith 1967 ; Gardner *et al.* 1969) et

Peut-être que n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela.

Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

de nombreuses bactéries naturelles non sujettes à l'action des antibiotiques (Mare 1968 ; Datta 1969).

La transférabilité de ces plasmides ne peut constituer un danger dans la propagation des résistances dans notre cas pour plusieurs raisons: un nombre très limité de souches porteuses, une physiologie inadaptée des micro-organismes, une fréquence de transfert faible estimée à moins de 10^{-4} par cellules donneuses.

VI.2.6/ Conclusion

Malgré l'existence d'une multirésistance aux antibiotiques de quelques micro-organismes des eaux minérales décrite par plusieurs auteurs, il apparaît difficile de parler de risques pour la santé publique. Ces auteurs omettent alors de repositionner cette microflore dans un plan quantitatif, physiologique et face aux caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du tube digestif de l'Homme.

Nos résultats écartent tous risques inhérents à la consommation des eaux minérales plates des sources Vauban et du Clos de l'Abbaye. Cette conclusion est confortée par les travaux épidémiologiques de Leclerc (1994), lesquels ne révèlent aucun méfait sur la santé publique via les eaux minérales.

VII/ Méthodes nouvelles d'investigation de la microflore des eaux minérales

VII.1/ Dénombrement et caractérisation des bactéries de l'eau minérale par une méthode « Direct Viable Count » modifiée

VII.1.1/ Identification des isolats de l'eau minérale

Parmi les différents phénotypes bactériens isolés des eaux minérales de l'émergence, de la source Vauban et de la Source du Clos de l'Abbaye, 15 phénotypes représentatifs sont sélectionnés (10 pour Vauban et 5 pour Source du Clos de l'Abbaye). Tous sont encore des bacilles à Gram négatif, oxydase positive (ou faiblement positive) et non fermentatifs.

Deux systèmes d'identification, API 20NE et BIOLOG GN, sont utilisés pour tenter d'identifier ces isolats (Tableau 32). La galerie API 20NE identifie 60% des isolats avec un niveau acceptable ou plus. Les autres souches sont caractérisées avec une faible discrimination (20%), voire incertaine au niveau de l'espèce (20%). La galerie BIOLOG GN n'identifie seulement que 33,3% des isolats testés avec un index de similitude $\geq 0,500$ (bonne identification). Quatre isolats sont identifiés avec une pauvre certitude comme *Pseudomonas corrugata*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Pseudomonas putida*. Les identifications avec des index de similitude $< 0,300$ sont hautement improbables, notamment pour les isolats assimilés au genre *Vibrio* lequel est aéroanaérobie facultatif. Seulement quatre isolats (Fs, Ys, Vv et Wv) sont identifiés de la même manière par les deux systèmes. Pourtant deux d'entre elles (Fs et Wv) présentent une pigmentation anormale. Deux souches (As et Ev) sont identifiées comme *Pseudomonas fluorescens* en API 20NE et *Pseudomonas corrugata* par BIOLOG GN malgré l'absence de pigmentation caractéristique. Les isolats Zs, Jv, Rv et Zv sont identifiés comme *Sphingomonas paucimobilis* par la galerie API 20NE et hormis la souche Zs, ces micro-organismes présentent une pigmentation jaune non fluorescente caractéristique et non diffusible. En raison d'une pigmentation orange et de considérations écologiques, la souche Uv était plutôt *Brevundimonas vesicularis* (BIOLOG GN, sim 0,673) qu'*Agrobacterium radiobacter* (API 20NE, %id 98%). L'identité de la souche Jv pourrait être *Alcaligenes latus* (BIOLOG GN, sim 0,769) plutôt que *Sphingomonas paucimobilis* (API 20NE, %id 84%), du fait de son coefficient de similitude élevé en BIOLOG GN, de sa pigmentation jaune et de sa forme ovoïde (Holt *et al.* in Bergey's Manual[®] of Determinative Bacteriology).

Tableau 33: Comparaison de l'activité (CMI) *in vitro* de différentes quinolones et fluoroquinolones sur des bactéries isolées d'eaux minérales à l'émergence (Source du Clos de l'Abbaye et Vauban).

Souche*	CMI ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de l'agent antimicrobien [§]						
	AN	Pi	AR	NOR	OFX	PEF	CIP
As	62,5	125	125	15,62	$\leq 0,49$	1,95	0,98
Fs	62,5	62,5	31,25	15,62	3,91	>250	0,98
Hs	>250	>250	>250	62,5	62,5	>250	>250
Ys	62,5	250	15,62	62,5	7,81	15,62	7,81
Zs	>250	>250	>250	125	3,91	>250	7,81
Ev	125	>250	15,62	62,5	7,81	>250	0,98
Gv	>250	>250	>250	15,62	3,91	15,62	1,95
Jv	0,98	3,91	0,49	$\leq 0,49$	0,98	7,81	0,98
Pv	15,63	31,25	62,5	15,62	$\leq 0,49$	$\leq 0,49$	1,95
Rv	125	>250	7,81	62,5	3,91	7,81	7,81
Uv	>250	>250	>250	62,5	15,62	31,25	15,62
Vv	62,5	250	125	31,25	7,81	15,62	7,81
Wv	125	>250	62,5	62,5	15,62	7,81	$\leq 0,49$
Zv	250	>250	250	62,5	7,81	7,81	3,91

* isolé de l'émergence : s: Source du Clos de l'Abbaye et v, Vauban.

§ AN, Acide Nalidixique ; Pi, Acide Pipémidique ; AR, Fluméquine ; NOR, Norfloxacin ; OFX, Ofloxacin ; PEF, Pefloxacin et CIP, Ciprofloxacin.

VII.1.2/ La sensibilité des isolats aux (fluoro)quinolones

Les CMI de 3 quinolones et de 4 fluoroquinolones sont déterminées suivant des méthodes standard (Soussy 1997) de manière à apprécier la sensibilité ou la résistance de nos isolats (Tableau 33). La souche Hv n'est pas étudiée à cause de sa faible croissance en bouillon Mueller Hinton.

La souche Jv s'est révélée sensible à toutes les (fluoro)quinolones testées excepté la pefloxacin. De la même façon, certains isolats sont fortement sensibles à certains antibiotiques (JV_{NOR}, PV_{OFX,PEF}, WV_{CIP}, AS_{OFX}). A l'inverse, la souche Hs présente un haut niveau de résistance. Nous notons également une disparité dans les profils de résistance selon l'antibiotique choisi. Pourtant, la grande majorité des isolats est hautement résistante (MIC > 8 µg ml⁻¹ pour fluméquine et > 16 µg ml⁻¹ pour les acides nalidixique et pipémidique) aux quinolones de première génération. Ces antibiotiques sont ainsi d'un intérêt limité dans leur utilisation pour la méthode « Direct Viable Count » (DVC). Les CMI des fluoroquinolones sont généralement de plusieurs ordres de grandeur, plus basses que celles observées pour les quinolones de première génération. L'inhibition de 86% des isolats peut être réalisée par l'utilisation d'au moins 2 des 4 fluoroquinolones testées à des concentrations relativement basses ($\leq 7,81 \mu\text{g ml}^{-1}$). Cependant en terme de résistance au sens strict du terme, 64 % des isolats sont résistants à la Ciprofloxacine, 79% à l'Ofloxacine et 93% à la Pefloxacine et à la Norfloxacine.

VII.1.3/ Détermination des caractéristiques géométriques des isolats non inhibés

Les caractéristiques géométriques moyennes (surface, projection maximale et hypoténuse) des isolats non inhibés sont présentées dans le Tableau 34. Pour les isolats de la source du Clos de l'Abbaye, les surfaces mesurées varient de 0,6 à 1,8 µm², les projections maximales de 1,0 à 2,1 µm et l'hypoténuse de 1,3 à 2,7 µm. Pour ceux de la Source Vauban, ils varient respectivement de 1,2 à 1,8 µm², de 1,8 à 2,3 µm et de 1,9 à 2,7 µm. Ainsi, une plus large plage de valeur est observée pour l'hypoténuse que pour les deux autres paramètres. De plus, l'hypoténuse permet également une distinction plus efficace entre les différents isolats.

Tableau 34 : Détermination des caractéristiques géométriques moyennes des isolats des eaux minérales du griffon (Source du Clos de l'Abbaye et Vauban).

Souche*	Caractéristiques géométriques moyennes ($\pm \sigma$) [†]		
	Surface (μm^2)	Projection maximale (μm)	Hypoténuse (μm)
As	1,81 (0,32)	2,13 (0,21)	2,45 (0,17)
Fs	1,14 (0,05)	1,40 (0,05)	1,72 (0,05)
Hs	1,71 (0,30)	2,14 (0,21)	2,7 (0,19)
Ys	0,79 (0,18)	1,45 (0,10)	1,68 (0,09)
Zs	0,58 (0,091)	1,04 (0,07)	1,31 (0,05)
Ev	1,30 (0,12)	1,97 (0,11)	2,36 (0,08)
Gv	1,48 (0,19)	1,87 (0,07)	2,19 (0,06)
Jv	1,54 (0,12)	1,89 (0,11)	2,32 (0,11)
Pv	1,45 (0,08)	2,32 (0,11)	1,89 (0,12)
Rv	1,24 (0,11)	2,15 (0,13)	2,42 (0,11)
Uv	1,22 (0,18)	1,83 (0,10)	2,10 (0,09)
Vv	1,79 (0,17)	2,28 (0,09)	2,72 (0,13)
Wv	1,31 (0,18)	1,92 (0,12)	2,29 (0,12)
Zv	1,28 (0,21)	1,91 (0,09)	2,40 (0,10)

* isolé de l'émergence: s, Source du Clos de l'Abbaye et v, Vauban

[†] moyenne \pm écart type (250<n<400)

Tableau 35 : Modifications des caractéristiques géométriques moyennes de la souche Ev après 14 heures d'inhibition dans du Mueller Hinton en présence de différentes quinolones et fluoroquinolones.

Agent antimicrobien* ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Caractéristiques géométriques moyennes ($\pm \sigma$) [†]		
	Surface (μm^2)	Projection maximale (μm)	Hypoténuse (μm)
Sans antibiotique	1,30 (0,12)	1,97 (0,11)	2,36 (0,08)
AN (125)	6,31 (0,19)	5,28 (0,21)	6,19 (0,29)
AR (15.63)	4,18 (0,29)	3,73 (0,22)	4,32 (0,11)
NOR (62.5)	5,21 (0,19)	5,88 (0,19)	6,73 (0,21)
OFX (7.81)	5,77 (0,27)	5,78 (0,31)	6,71 (0,30)
CIP (0.98)	5,91 (0,28)	5,37 (0,22)	6,13 (0,17)

* AN, Acide Nalidixique; AR, Fluméquine; NOR, Norfloxacin; OFX, Ofloxacin et CIP, Ciprofloxacin.

[†] moyenne \pm écart type (250<n<400)

VII.1.4/ Altérations morphométriques des isolats après incubation dans un bouillon Mueller Hinton en présence de différentes (fluoro)quinolones

VII.1.4.1/ Morphométrie de la souche Ev après inhibition en présence de différentes (fluoro)quinolones.

Comme rapporté dans le Tableau 35, une période d'inhibition de 14 heures dans du Mueller Hinton contenant différents fluoroquinolones à des concentrations correspondantes aux CMI conduit à des augmentations significatives (de 1,8 à 4,8 fois) des caractéristiques géométriques moyennes de la souche Ev.

L'élongation bactérienne est moins prononcée après l'inhibition avec la Fluméquine. Les augmentations des paramètres géométriques varient selon l'antibiotique employé. Quoiqu'il en soit, toutes sont significatives et il semble ainsi plus judicieux de choisir les antibiotiques aux CMI les plus basses.

VII.1.4.2/ Morphométrie de différentes souches après incubation en Mueller Hinton contenant les fluoroquinolones les plus efficaces.

Deux périodes d'incubation (14 et 72 heures) en présence des antibiotiques sont étudiées. Ce choix est gouverné par la nécessité d'obtenir des résultats rapides et fiables comparés aux autres méthodes de dénombrement (14 h) et d'obtenir une élongation significative et discriminante entre ces différentes souches (72 h) (Tableau 36). Une incubation de 14h suffit pour acquérir des allongements significatifs de l'hypoténuse moyenne des isolats ($\geq 1,5$ fois). Ces augmentations sont parfois très importantes (de 2,4 à 3,8 fois la taille initiale; exemples de souches concernées: Uv, Zv, Pv, Ev, Wv et Fs). L'incubation prolongée (72 h) dans le bouillon Mueller Hinton en présence d'antibiotique conduit à des valeurs de l'hypoténuse identiques (souches Ys, Jv et Vv) et généralement plus basses que celles observées après une incubation de 14 h. De plus, dans certains cas, les mesures de l'hypoténuse des isolats inhibés 72 h ne sont pas significativement différentes de ceux des cellules non inhibées (souches Ev, Gv, Rv, Zv et Zs) voire même plus basses (souche As).

Ainsi, la différenciation des souches en culture mixte est aisée dans les communautés bactériennes des eaux de Vauban. L'hypoténuse moyenne la plus élevée qui caractérise les isolats non inhibés doit être moins importante que la plus petite hypoténuse des isolats inhibés 14 heures. Ce phénomène n'est pas observé pour les isolats de la Source du Clos de l'Abbaye. Par conséquent, le choix des cocktails d'antibiotiques devrait être plus judicieux pour réaliser

Tableau 36 : Modifications de l'hypoténuse moyen de différentes souches au cours de l'incubation en Mueller Hinton avec les fluoroquinolones les plus effectives.

Souche*	Agent† antimicrobien ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Hypoténuse en μm ($\pm \sigma$)§ après une incubation de		
		0h	14h	72h
As	PEF (1,95)	2,45 (0,17)	3,78 (0,21)	1,61(0,18)
Fs	OF (3,91)	1,72 (0,05)	6,56 (0,27)	4,70 (0,17)
Hs	NOR (62,5)	2,70 (0,19)	4,78 (0,16)	4,03 (0,17)
Ys	CIP (7,81)	1,68 (0,09)	2,46 (0,18)	2,47 (0,22)
Zs	OF (3,91)	1,31 (0,05)	2,02 (0,09)	1,51 (0,12)
Ev	CIP (0,98)	2,36 (0,08)	6,12 (0,26)	2,67 (0,28)
Gv	CIP (1,95)	2,19 (0,06)	3,42 (0,21)	2,39 (0,31)
Jv	CIP (0,98)	2,32 (0,11)	3,63 (0,21)	3,67 (0,19)
Pv	CIP (1,95)	1,89 (0,12)	4,91 (0,29)	3,02 (0,28)
Rv	OF (3,91)	2,42 (0,11)	4,63 (0,19)	2,59 (0,30)
Uv	CIP (15,63)	2,10 (0,09)	5,05 (0,27)	3,32 (0,33)
Vv	OF (7,81)	2,72 (0,13)	3,50 (0,17)	3,31 (0,26)
Wv	PEF (7,81)	2,29 (0,12)	7,02 (0,41)	3,27 (0,38)
Zv	CIP (3,91)	2,40 (0,10)	6,05 (0,33)	2,64 (0,31)

* isolé de l'émergence: s, Source du Clos de l'Abbaye et v, Vauban.

† NOR, Norfloxacin; PEF, Pefloxacin; OFX, Ofloxacin et CIP, Ciprofloxacin.

§ moyenne \pm écart type (250<n<400).

la caractérisation de chaque souche de la communauté microbienne de la Source du Clos de l'Abbaye.

VII.1.5/ Dénombrement et caractérisation des isolats dans des cultures mixtes expérimentales par la méthode DVC modifiée

Les Tableaux 37 et 38 rapportent respectivement les résultats quantitatifs initiaux déterminés par la coloration au Live/Dead et ceux obtenus par la méthode DVC modifiée, dans des cultures mixtes réalisées en bouillon Mueller Hinton et dans de l'eau minérale. La différenciation des isolats est évidente et à quelques exceptions près, les résultats de DVC sont toujours du même ordre de grandeur et pratiquement identiques avec ceux de l'inoculum initial.

VII.1.6/ Discussion

Les résultats d'identification confirment ceux déjà obtenus dans les précédentes études.

Bien que largement utilisée, la galerie API 20NE est décrite comme une méthode capable d'identifier seulement 30% des isolats bactériens aquatiques (Morais et Da Costa 1990; Amy *et al.* 1992; Brown et Leff 1996; Ferreira *et al.* 1996). Le taux de 60% d'identification rapporté ici est plus élevé que ceux précédemment publiés dans la littérature, cependant certaines souches (Zs, Uv et Wv) restent sujet à caution du fait de l'absence ou de la pigmentation anormale tout au moins sur gélose R2A (Morais et Da Costa 1990 ; Mavridou 1992). Les essais d'identification des isolats par BIOLOG GN sont peu concluants. Ceci est en accord avec d'autres études (Amy *et al.* 1992; Zheng et Kellogg 1994). Néanmoins, un taux de 74% d'identification est obtenu avec ce type de système pour les isolats d'eaux souterraines profondes (Jain *et al.* 1997). Au regard des difficultés fréquemment rencontrées dans l'identification des micro-organismes des eaux minérales, il n'est pas étonnant que de nouvelles espèces soient décrites parmi les *Pseudomonas* fluorescents (Coroler *et al.* 1996; Elomari *et al.* 1996) et le groupe de *Pseudomonas* pigmentés en jaune (Gomes *et al.* 1996).

Les difficultés pour obtenir une estimation fiable de la résistance aux antibiotiques pour des bactéries aquatiques sont antérieurement soulevées (Jones *et al.* 1986). L'utilisation de la méthode des disques par diffusion et la standardisation de la température sont recommandées (Jones *et al.* 1986). La température d'incubation dans la détermination des CMI est différente de celle requise dans les recommandations techniques (Anon. 1996). La température

Peut-être que n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela.
Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

Tableau 37 Dénombrement et caractérisation de souches parmi une communauté bactérienne dans du bouillon Mueller Hinton par la méthode DVC modifiée.

	Souche* et log initial [§] des cellules viable.ml ⁻¹ ($\pm \sigma$) [†] dans mélange expérimental	Log des cellules viables.ml ⁻¹ ($\pm \sigma$) [†] déterminé par la méthode DVC modifiée
Zs	6,72 (0,10)	6,72 (0,08)
Ys	6,53 (0,15)	6,54 (0,11)
Fs	6,14 (0,09)	6,62 (0,09)
As	5,84 (0,11)	6,32 (0,10)
Fs	5,00 (0,07)	6,36 (0,14)
Ys	6,00 (0,12)	6,51 (0,13)
Gs	7,58 (0,09)	6,69 (0,10)
As	7,75 (0,07)	7,04 (0,08)
Ys	7,92 (0,07)	7,74 (0,10)
Fs	7,89 (0,11)	7,80 (0,05)
Zs	8,32 (0,08)	8,04 (0,11)
Pv	6,47 (0,07)	6,89 (0,09)
Gv	6,84 (0,05)	6,50 (0,10)
Vv	6,30 (0,08)	6,99 (0,06)
Rv	6,47 (0,11)	6,88 (0,12)
Ev	6,69 (0,09)	6,96 (0,14)
Ev	6,30 (0,12)	6,25 (0,09)
Uv	6,14 (0,09)	6,67 (0,11)
Wv	6,04 (0,10)	6,25 (0,07)

* isolé de l'émergence: s, Source du Clos de l'Abbaye et v, Vauban.

§ le log initial des cellules viables ml⁻¹ déterminé après coloration au Live/Dead.

† moyenne \pm écart type (n=3)

Tableau 38: Dénombrement et caractérisation de souches parmi une communauté bactérienne d'une eau minérale par la méthode DVC modifiée.

	Souche* et log initial [§] des cellules viable.ml ⁻¹ ($\pm \sigma$) [†] dans mélange expérimental	Log des cellules viables.ml ⁻¹ ($\pm \sigma$) [†] déterminé par la méthode DVC modifiée
Zs	7,39 (0,13)	7,23 (0,09)
Ys	7,27 (0,11)	7,25 (0,07)
Fs	7,27 (0,06)	7,14 (0,10)
As	6,80 (0,12)	6,92 (0,11)
Fs	7,27 (0,09)	7,14 (0,07)
Ys	7,27 (0,11)	7,20 (0,12)
Hs	5,96 (0,09)	5,73 (0,11)
As	6,80 (0,09)	6,92 (0,08)
Ys	7,27 (0,11)	7,70 (0,11)
Fs	7,27 (0,12)	7,14 (0,08)
Zs	7,39 (0,10)	6,98 (0,11)
Pv	7,71 (0,09)	7,23 (0,07)
Gv	6,96 (0,05)	7,12 (0,05)
Vv	7,70 (0,08)	6,38 (0,09)
Rv	7,53 (0,11)	7,14 (0,07)
Ev	6,77 (0,12)	7,30 (0,06)
Ev	6,77 (0,09)	7,11 (0,13)
Uv	7,14 (0,06)	7,30 (0,08)
Wv	7,49 (0,07)	7,17 (0,08)

* isolé de l'émergence: s, Source du Clos de l'Abbaye et v, Vauban.

[§] le log initial des cellules viables ml⁻¹ déterminé après coloration au Live/Dead.

[†] moyenne \pm écart type (n=3)

habituellement utilisée, 35-37°C sont beaucoup plus élevées que celles rencontrées *in situ*. En effet, les températures des griffons sont de 26°C et 18°C respectivement pour la Source Vauban et la Source du Clos de l'Abbaye. La température de 25°C est donc choisie comme compromis entre la température expérimentale et celle de l'émergence. Elle permet également la multiplication des bactéries avec un taux relativement élevé. Le but de notre étude est de déterminer les quinolones les plus efficaces pour être appliquées à la méthode "Direct Viable Count" sur la microflore des eaux minérales se multipliant à 18-26°C et non pour détecter la résistance bactérienne intrinsèque à ces antibiotiques. Ainsi nos déterminations sont pratiquées dans des bouillons incubés à 25°C. Cependant, basée sur le point critique de la CMI et en terme de résistance, des sensibilités intermédiaires et des profils de résistance aux (fluoro)quinolones sont observés pour la grande majorité de nos isolats. La résistance aux quinolones de première génération et particulièrement à l'acide nalidixique est fréquemment rapportée pour un nombre considérable d'isolats bactériens aquatiques et des eaux minérales (Amy *et al.* 1992; Papapetropoulou *et al.* 1994; Massa *et al.* 1995; Joux et LeBaron 1997). Pourtant, il n'existe pas de preuves directes pour que ces bactéries, naturellement résistantes aux antibiotiques et retrouvées dans les eaux minérales posent le moindre risque pour la santé publique (Rusin *et al.* 1997). Parmi les (fluoro)quinolones, la Ciprofloxacine est assimilée comme la molécule la plus efficace selon Papapetropoulou *et al.* (1994) et Joux et LeBaron (1997). Au moins 2 des 4 fluoroquinolones testées peuvent inhiber la croissance des différents isolats à des concentrations correspondant à des valeurs rencontrées pour les quinolones de première génération utilisées dans le cocktail d'antibiotique décrit par Kogure *et al.* (1984). Pourtant, les nouvelles fluoroquinolones plus efficaces, sur le genre *Pseudomonas* et les taxons associés (Cunha *et al.* 1997) devraient être testées afin d'assurer l'inhibition de la croissance à des concentrations en antibiotique plus basses.

Afin de réaliser une distinction possible entre les souches inhibées et résistantes (capable ou non de se diviser), les caractères de la surface, des projections maximales et de l'hypoténuse sont déterminés. La surface et les projections maximales sont mesurées par ordinateur. Il semble intéressant de calculer l'hypoténuse qui donne une réelle longueur de la bactérie. L'hypoténuse comme valeur référentielle permet une atténuation des erreurs générées lors du traitement de l'image à l'aide du logiciel Perfect Image™. En effet, ces défauts sont générés de manière multidirectionnelle avec la mesure de la surface alors qu'ils ne sont plus que bidirectionnels dans le cas de l'hypoténuse. Ce paramètre s'est montré plus discriminant que la surface et les projections.

Peele et Colwell (1981) utilisent les mesures de surface pour les cultures en eau de mer, qui révèlent généralement des cellules polymorphes après incubation dans des conditions variées de croissance et nutritive. En dépit de la présence de cellules ovoïdes, la mesure de la longueur est plus discriminante dans notre étude. Barcina *et al.* (1995) préconisent la mesure des biovolumes, afin d'obtenir une meilleure estimation des croissances cellulaires dues à l'incorporation de nutriments. Pourtant, dans le cas de bâtonnets, la croissance implique principalement des variations en longueur, et la détermination des biovolumes semble alors mieux adaptée pour les coques comme le suggèrent Barcina *et al.* (1995).

Singh *et al.* (1989) montrent qu'une élongation cellulaire supérieure ou égale à 1,5 fois la taille initiale peut être considérée comme une valeur fiable quant à la détermination de la viabilité des bactéries par le test DVC. Dans notre étude, ce coefficient d'élongation est compris entre 1,8 et 2,8 pour la souche Ev et toujours $\geq 1,5$ pour les autres isolats donc est significatif quelque soit l'antibiotique testé.

La diminution des dimensions moyennes de l'hypoténuse après 14h est expliquée par une fragmentation de la coloration à l'intérieur des cellules. En fait, les longueurs des bactéries augmentent même après une incubation de 14 h; mais l'analyse d'image et le fluorochrome donnent alors une coloration hétérogène dans le corps bactérien. L'incubation de 14 heures est suffisante dans les conditions opératoires définies. Les élongations sont significatives et permettent rapidement de différencier les morphotypes des souches inhibées des non inhibées ou encore les cellules viables, des mortes.

Dans la détermination de la morphométrie des souches inhibées par les antibiotiques, le coefficient d'élongation varie de 1,5 à 3,8. Ces valeurs sont apparues plus importantes dans les tests sur ces isolats de la source Vauban. Les isolats de la Source du Clos de l'Abbaye semblent moins sensibles aux substrats. Ce phénomène a déjà été montré dans une autre étude concernant la culture de ces isolats sur divers milieux (PCA, PCA/10, R2A, ...).

La sensibilité d'une souche à un antibiotique donné serait définie par la CMI. Dans notre méthode, nous souhaitons utiliser la concentration qui inhibe toute répllication mais permet le fonctionnement des autres voies de synthèse, comme Buchrieser et Kaspar (1993) le recommandent. De fortes concentrations pourraient conduire à l'inhibition métabolique et parfois à la mort cellulaire ou la lyse des cellules sensibles comme le remarquent Joux et

Peut-être que n'est entièrement vrai, et peut-être même pas cela.

Eduard Douwes Dekker (1820-1887)

LeBaron (1997). Néanmoins, les concentrations en antibiotiques élevées, utilisées dans notre étude (quinolone: $\geq 16 \mu\text{g ml}^{-1}$ et fluoroquinolone: $\geq 4 \mu\text{g ml}^{-1}$), ne conduisent pas à de tels effets, les isolats ne sont pas lysés ou sujets à des effets secondaires non spécifiques.

Le choix de mesurer la longueur plutôt que la surface est à nouveau confirmé par l'absence de formes cellulaires atypiques après incubation en Mueller Hinton, en eau minérale naturelle, avec ou sans antibiotiques ; ces formes sont rencontrées dans des cultures en eau de mer (Peele et Colwell 1981).

Un de nos objectifs est d'éviter d'ajouter des nutriments lors de la réalisation du DVC afin de conserver la nature oligotrophe originelle de l'eau et d'éviter des effets inhibiteurs ou la croissance d'éventuels contaminants eutrophiques. Ainsi, l'ajout de substrat exogène provient uniquement du milieu de pré culture soit moins de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de matière organique.

Dans les deux expériences, la méthode apparaît envisageable et efficace dans les conditions opératoires définies. Elle peut être améliorée par la combinaison de plusieurs antibiotiques pour dénombrier et caractériser une seule et même bactérie comme le décrivent Joux et LeBaron (1997). De plus, nous pouvons utiliser de nouvelles fluoroquinolones, actives sur un grand nombre de micro-organismes (Cunha *et al.* 1997).

VII.1.7/ Conclusion

Le but de cette méthode est de dénombrier et caractériser, rapidement et directement, les bactéries dans les communautés simples et relativement bien connues des eaux minérales. Cette technique est fondée sur la résistance "spécifique" d'espèces bactériennes aux (fluoro)quinolones, antibiotiques inhibant la réplication. En présence de cocktails d'antibiotiques, certaines espèces sont caractérisées par leurs morphotypes (formes allongées) et alors dénombrées dans des populations mixtes. Cette méthode peut être également appliquée pour estimer les cultures mixtes rencontrées dans des bio fermenteurs, dans des aliments aux microflores connues et à l'écologie bactérienne. Elle semble prometteuse car les caractéristiques morphologiques, physiologiques et (ou) métaboliques ainsi que les sondes nucléiques commercialisées ne sont pas toujours disponibles pour d'une part, identifier les micro-organismes recherchés et d'autre part, déterminer leur viabilité.

VII.2/ Etude de la stabilité de la microflore des eaux minérales par les profils d'acides gras totaux. Evolution des profils d'acides gras des isolats en culture pure sur milieu R2A et en eau minérale

VII.2.1/ Identification des phénotypes isolés de l'eau minérale embouteillée
(Source Vauban)

Au cours de la campagne de prélèvements (début février à fin mars 1997), neuf phénotypes sont constamment isolés au moment de l'embouteillage (Tableau 39). Après cinq jours d'embouteillage, trois de ces phénotypes (V2, V5 et V8) ne sont plus détectables sur milieu gélosé R2A. La galerie API 20 NE n'identifie correctement (% ident. \geq 90%) que 44,44 % des phénotypes et la galerie BIOLOG GN seulement 33,33% (sim. \geq 0,500) Deux isolats seulement sont identifiés de la même manière (*Brevundimonas vesicularis*) par les deux systèmes. Certaines identifications restent douteuses (ex : *Capnocytophaga gingivalis*, *Xanthomonas oryzae*) notamment en galerie BIOLOG GN. Cette même galerie ne donne aucune identification pour deux des phénotypes.

Le nombre de phénotypes isolés des eaux embouteillées au cours de cette étude est du même ordre de grandeur (1 à 20 espèces bactériennes par marque d'eau minérale) que celui rapporté dans la littérature (Manaiia *et al.* 1990 ; Ferreira *et al.* 1996). La disparition de certains phénotypes au cours de la conservation des eaux embouteillées est déjà signalée dans d'autres travaux (Ferreira *et al.* 1996). Les espèces *Sphingomonas paucimobilis* et *B. vesicularis* sont fréquemment observées dans d'autres études sur les microflores aquicoles et des eaux minérales (Morais et Da Costa 1990 ; Amy *et al.* 1992 ; Brown et Leff 1992 ; Leclerc 1994a ; Ferreira *et al.* 1996). L'espèce *B. vesicularis* avec les espèces *Pseudomonas fluorescens*, *S. paucimobilis*, *Pseudomonas stutzeri* et les genres *Comamonas* et *Xanthomonas* constituent la microflore commune aux eaux minérales commercialisées en France (Guillot et Leclerc 1993). A notre connaissance, la présence d'*Oligella urethralis* n'est jamais signalée dans les eaux minérales. Cette espèce est généralement isolée du tractus urinaire de l'homme et est considérée comme pratiquement dépourvue de pouvoir pathogène (Holt *et al.* 1994). Ces résultats confirment les difficultés d'identification des bactéries aquicoles et des eaux minérales (Morais et Da Costa 1990 ; Amy *et al.* 1992 ; Brown et Leff 1996). Il n'est donc pas surprenant que de nouvelles espèces soient régulièrement décrites parmi les *Pseudomonas* à pigment fluorescent (Coroler *et al.* 1996 ; Elomari *et al.* 1996 ; Verhille *et al.* 1997 ;

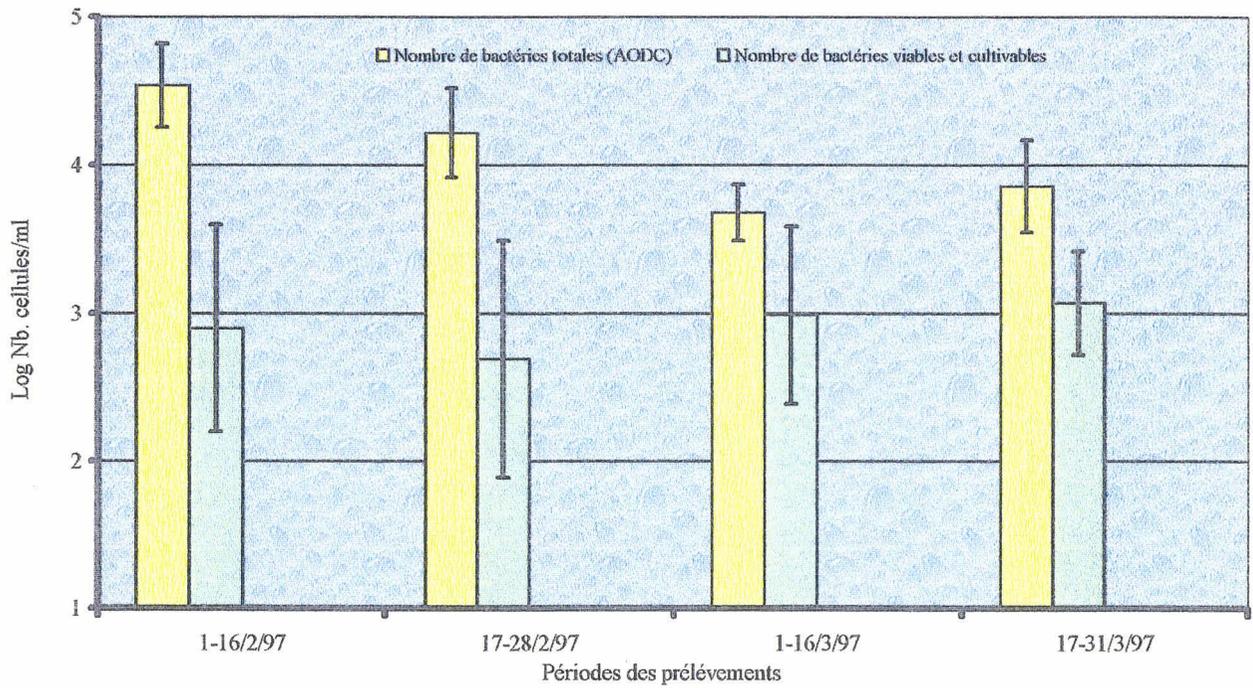


Figure 33 : Stabilité du logarithme du nombre de bactéries totales (AODC) et viables cultivables (sur milieu R2A) dans les eaux minérales embouteillées de la source Vauban. Les barres représentent les intervalles de confiance ($P = 0,05$).

Dabboussi *et al.* 1998 ; Daboussi *et al.* Soumis, Daboussi *et al.* Soumis) et les genres voisins à pigment jaune (Gomes *et al.* 1996).

VII.2.2/ Stabilité du logarithme du nombre de bactéries totales et viables cultivables

Les résultats obtenus (Figure 33) montre qu'après cinq jours de conservation, la population bactérienne totale des eaux embouteillées (déterminée par AODC) est stable quelles que soient les périodes d'embouteillage. La population viable et cultivable sur milieu R2A, est également stable mais ne représente qu'approximativement 10% de la population totale.

Les résultats quantitatifs obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux relevés dans la littérature (Manaia *et al.* 1990) ; la stabilité observée est également conforme à d'autres travaux (Ferreira *et al.* 1994). Cette stabilité quantitative des microflores après cinq jours d'embouteillage n'exclut cependant pas d'énormes disparités dans les numérations réalisées juste après embouteillage (Manaia *et al.* 1990) et des variations quantitatives saisonnières des microflores des aquifères (Quevedo-Sarmiento *et al.* 1986 ; Zheng et Kellogg 1994).

VII.2.3/ Stabilité des profils d'Acides Gras totaux des microflores embouteillées

Les profils enregistrés à différentes périodes d'embouteillage sont stables et restent très simples à analyser (Figure 34). Neuf Acides Gras (A.G.) sont systématiquement observés et cinq de manière inconstante. Globalement, les A. G. saturés (C14: 0, C15: 0 et surtout C16: 0 et C18: 0) ainsi que les A. G. monoinsaturés en configuration *trans* assimilables à des saturés (C16: 1/9 et C18: 1/11) sont largement prédominants (\cong 75% des A. G. totaux). Le rapport A.G. *trans* / A.G. *cis* varie entre 0,5 et 1,5. En dépit de l'isolement exclusif de bactéries à Gram négatives (Tableau 39), les A. G. hydroxylés (caractéristiques du LPS de ces bactéries) sont pratiquement absents des profils à l'exception du C16: 0-2OH et occasionnellement du C10: 0-3OH.

Les profils des A. G. totaux des microflores embouteillées ne correspond donc absolument pas aux profils d'A. G. des genres bactériens isolés. Par exemple, chez *Brevundimonas vesicularis*, *Pseudomonas stutzeri* et *Sphingomonas paucimobilis*, les A.G. monoinsaturés *cis* sont majoritaires (65 à 70% des A.G. totaux) et les A.G. hydroxylés sont variés et représentent approximativement 10% des A.G. totaux tout au moins dans les conditions standard du protocole MIS (Stead 1992 ; Vancanneyt *et al.* 1996).

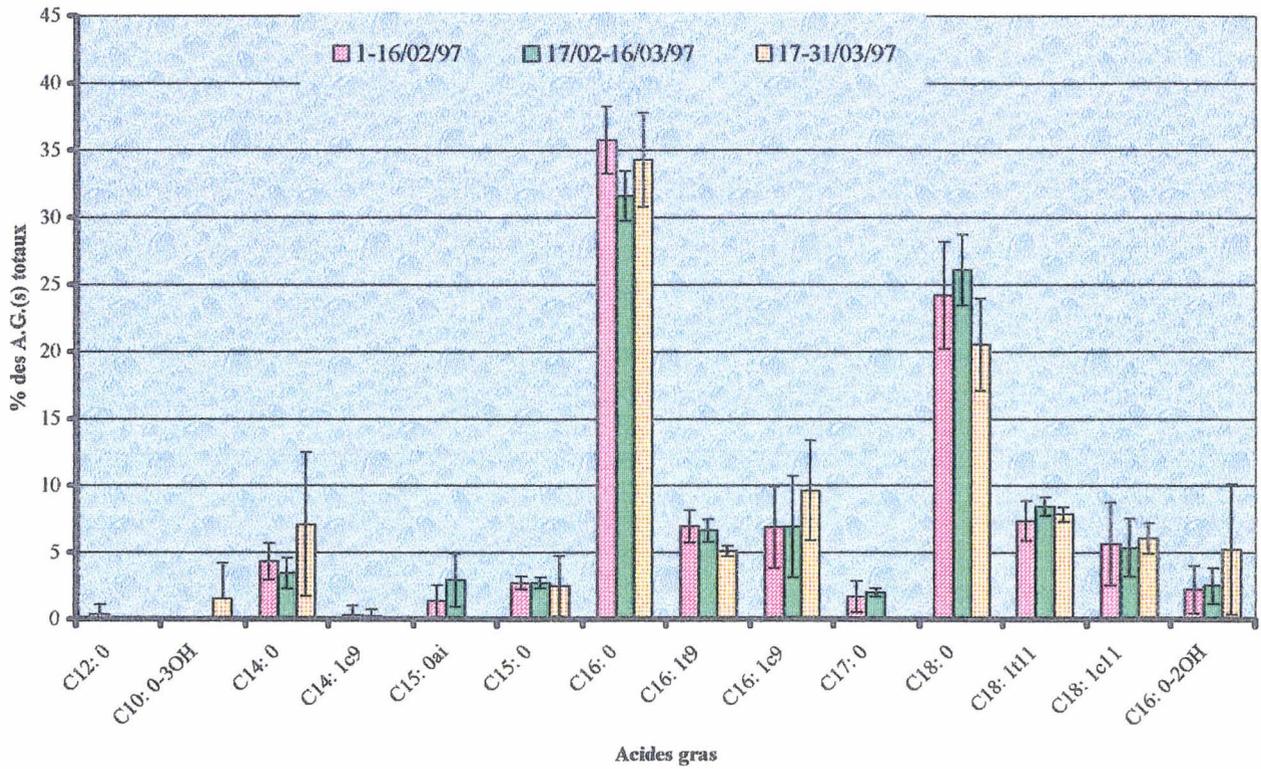


Figure 34: Stabilité des profils d'Acides Gras Totaux des microflores embouteillées de la source Vauban. Les barres représentent les intervalles de confiance (P=0,05).

Une étude reste cependant à mener sur la détection d'A.G. hydroxylés éventuellement liés en liaison de type amide ; ils sont fréquemment rencontrés tout au moins chez les bactéries d'origine tellurique (Zelles *et al.* 1997). Le rapport A.G. *trans* / A.G. *cis* (> à 0,5) indique que ces bactéries sont en état de stress probablement nutritif conformément à la définition généralement admise (White et Ringelberg 1997 ; Kieft *et al.* 1994) ; nous n'observons cependant pas d'A.G. cyclo. Les pourcentages relatifs en C18: 0 sont très élevés. De tels pourcentages sont cependant parfois rapportés pour les communautés bactériennes des sédiments (Guckert *et al.* 1985) ou des eaux de lacs (Morgan *et al.* 1991). En ce qui concerne les aquifères, des pourcentages élevés en C18: 0 sont corrélés avec une pollution (Ludvigsen *et al.* 1997), cependant dans une autre étude, les séries témoins et polluées contiennent toutes deux de forts pourcentages en cet A.G. (Franzmann *et al.* 1996). L'analyse des profils d'A.G. totaux reste très simple et permet d'apprécier rapidement la stabilité des microflores embouteillées.

VII.2.4/ Etude de l'évolution des profils d'Acides Gras des différents phénotypes après culture pure sur milieu R2A et en eau minérale

Tous les phénotypes se sont développés sur milieu R2A et en eau minérale. L'absence de culture des phénotypes V2, V5 et V8 précédemment enregistrée dans les microflores embouteillées semble donc résulter d'une compétition vis-à-vis des éléments nutritifs ou d'un phénomène d'antagonisme bactérien. La comparaison, après culture en eau minérale, des profils d'A.G. de ces trois isolats avec celui du phénotype V9 (dominant dans les eaux embouteillées après cinq jours) ne permet pas de détecter de grandes différences à l'exception du phénotype V2 qui présente moins d'A.G. saturés (C16: 0 et C18: 0) et plus de C18: 1c11 (Tableau 40). L'étude des A.G. d'*Oligella urethralis* (V8 et V9) après culture pure sur R2A et en eau minérale (Tableau 40) ainsi que leurs comportements de croissance dans l'eau justifient l'individualisation de deux phénotypes différents. De même, les phénotypes V3 et V4 identifiés tous deux comme des *Pseudomonas stutzeri* montrent des profils en A.G. différents après culture en eau minérale bien que les profils soient identiques après culture sur R2A (Tableau 41). Les phénotypes V1 et V7 identifiés comme des *Brevundimonas vesicularis* présentent des profils différents aussi bien après culture sur R2A qu'en eau minérale (Tableau 42) justifiant de ce fait la séparation en deux phénotypes distincts. De manière générale, la culture pure en eau minérale conduit à l'observation des profils atypiques précédemment

Tableau 40 : Evolution des A.G. des phénotypes sous-dominants en eau minérale embouteillée (V2, V5 et V8) par rapport au phénotype dominant (V9) en fonction des conditions de culture. Comparaison d'*Oligella urethralis* V8 et V9.

A.G.	% des différents A.G.* chez les phénotypes après culture sur R2A ou en EM**							
	V2		V5		V8		V9	
	R2A	EM	R2A	EM	R2A	EM	R2A	EM
C10: 0					2,7 (1,2)			
TR (27.8)	3,1 (0,3)	4,2 (0,5)			1,4 (0,1)			
C12: 0					3,8 (0,9)		2,9 (0,2)	
C14:0		4,5 (0,2)		2,2 (0,2)		4,0 (0,2)	6,0 (0,4)	2,5 (0,2)
C15:0						1,3 (0,1)	2,1 (0,1)	1,1 (0,1)
C16:0	2,9 (0,6)	22,0 (0,8)	16,9 (1,9)	43,8 (1,8)	1,1 (0,2)	36,9 (1,9)	36,0 (1,0)	42,9 (2,4)
C17:0						1,3 (0,2)	tr†	
C18:0	7,5 (0,6)	20,8 (0,9)	10,9 (0,9)	37,5 (1,8)	1,2 (0,4)	52,4 (3,1)	30,4 (1,2)	49,8 (2,7)
C12: 0-2OH	2,1 (0,1)							
C12: 0-3OH					2,4 (0,5)			
C14: 0-2OH			1,7 (0,5)					
C16: 0-2OH	2,9 (0,1)							
C16: 1c 9	tr		5,5 (0,5)	2,0 (0,1)	10,2 (0,7)		10,3 (0,6)	
C16: 1t 9	tr				tr	1,3 (0,1)	4,0 (0,2)	
C17: 0 cyclo					9,7 (1,6)			
C18: 1c 11	75,7 (1,4)	43,5 (1,2)	65,0 (0,3)	14,5 (0,9)	67,5 (4,4)		3,9 (0,1)	
C18: 1t 11						2,8 (0,2)	4,4 (0,2)	
C19: 0 cyclo	5,8 (2,2)	5,0 (0,1)						
TR (41)								1,5 (0,3)
TR (53)								2,2 (0,3)

* moyenne (± écart type) sur 3 répétitions

** R2A : milieu gélosé ; EM : Eau Minérale

† tr : trace

Tableau 41 : Etude de l'évolution des profils d'A.G. de *Pseudomonas stutzeri* V3 et V4 et de *Sphingomonas paucimobilis* V6 en fonction des conditions de culture.

A.G.	% des différents A.G.* chez les phénotypes après culture sur R2A ou en EM**					
	V3		V4		V6	
	R2A	EM	R2A	EM	R2A	EM
C12: 0	6,2 (0,5)	12,8 (1,0)	7,3 (0,1)			
C13: 0					1,0 (0,1)	
C14: 0	5,6 (0,3)	12,3 (0,4)	6,1 (0,1)	18,0 (1,5)		8,5 (0,5)
C15: 0	2,8 (0,3)		2,4 (0,1)			1,6 (0,1)
C16: 0	27,6 (1,1)	30,2 (0,7)	27,8 (0,7)	54,0 (2,4)	12,4 (0,4)	44,8 (2,7)
C18: 0	tr†	32,4 (1,3)		9,4 (0,3)	11,4 (0,8)	24,0 (1,5)
C20: 0					2,2 (0,8)	
C10: 0-3OH	2,9 (0,8)		2,7 (0,6)			
C12: 0-2OH	3,6 (0,4)					
C14: 0-2OH					2,2 (0,7)	
C16: 1c 9	47,9 (1,1)	5,0 (0,4)	48,8 (2,1)	8,7 (0,4)	30,4 (2,4)	6,1 (0,3)
C16: 1t 9					1,1 (0,1)	
C17: 0cyclo	tr		Tr		1,8 (0,1)	
C18: 1c 11	7,0 (0,2)	3,7 (0,2)	4,9 (0,1)	2,9 (0,3)	37,5 (1,0)	9,7 (0,8)
TR(53)				7,0 (0,2)		5,3 (0,3)

* moyenne (\pm écart type) sur 3 répétitions

** R2A : milieu gélosé ; EM : Eau Minérale

† tr : trace

Tableau 42 : Etude de l'évolution des A.G. de *Brevundimonas vesicularis* V1 et V7 en fonction des conditions de culture.

A.G.	% des différents A.G.* chez les phénotypes après culture sur R2A ou en EM**			
	V1		V7	
	R2A	EM	R2A	EM
C14: 0	4,8 (0,4)	5,8 (0,3)	2,0 (0,2)	
TR (33,65)		10,8 (0,4)		
C15: 0	2,9 (0,3)		6,1 (0,2)	
C16: 0	24,1 (2,2)	37,2 (1,0)	18,2 (0,8)	20,2 (1,3)
C17: 0			4,4 (0,3)	1,0 (0,1)
C18: 0		35,4 (1,2)	8,1 (0,4)	44,4 (2,6)
C12: 0-3OH	3,7 (0,1)			
C16: 1c 9	1,6 (0,4)		11,4 (0,6)	
C17: 0 cyclo	12,2 (0,5)		6,9 (0,1)	
C18: 1c 11	48,8 (4,6)	10,8 (0,2)	38,0 (0,7)	22,3 (1,8)
C18: 1t 11	1,9 (0,2)			tr†
C19: 0 cyclo			4,9 (0,5)	1,5 (0,1)
C22: 1c				9,3 (0,8)
TR (41)				1,3 (0,2)

* moyenne (± écart type) sur 3 répétitions

** R2A : milieu gélosé et EM : Eau Minérale

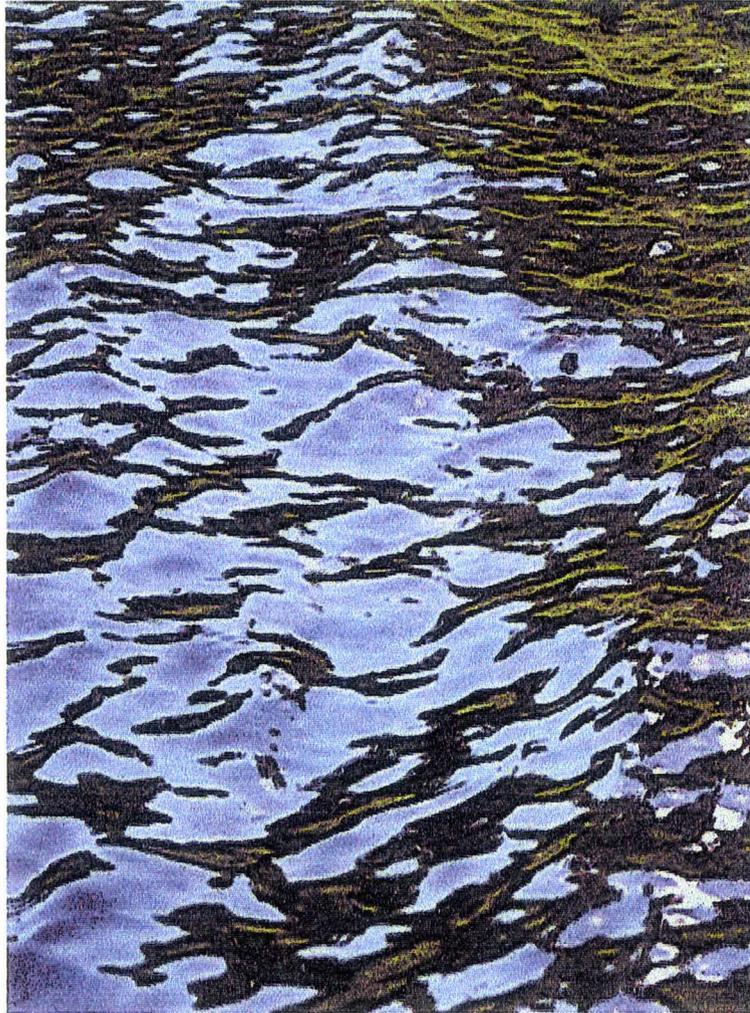
† tr : trace

observés (Tableaux 40, 41 et 42; Figure 34). Les A.G. monoinsaturés en configuration *trans* ne sont cependant pas retrouvés après culture pure en eau minérale ; ils pourraient donc être considérés comme des marqueurs de bactéries viables mais non cultivables ou de bactéries mortes. Il est remarquable de noter la présence fréquente d'A.G. non identifiés (temps de rétention de 41 ou de 53 min.) chez les phénotypes adaptés à la croissance en eau minérale (V4, V6, V7 et V9). Des études sont en cours pour déterminer l'évolution des profils d'A.G. de bactéries indésirables et (ou) contaminantes après culture dans l'eau minérale. Il sera alors possible d'apprécier l'intérêt et la validité de l'analyse des profils d'A.G. totaux pour la détection de ces bactéries comme il a été récemment décrit pour le contrôle des vins embouteillés (Malfeito-Ferreira *et al.* 1997). Les profils d'A.G. observés après culture sur milieu R2A (Tableaux 40, 41 et 42) se rapprochent, bien qu'imparfaitement, de ceux décrits dans la littérature (Stead 1992 ; Vancanneyt *et al.* 1996). Dans ce cas, des A.G. hydroxylés sont de nouveau observés et les pourcentages en A.G. monoinsaturés en configuration *cis* se rapprochent de ceux décrits pour ces genres bactériens.

VII.2.5/ Conclusion

Les acides gras représentent un sérieux outil dans la caractérisation et la discrimination bactérienne.

De plus, l'obtention de profils d'acides gras totaux dans les échantillons d'eaux minérales permet d'établir un profil de la constitution biologique du milieu. Il est possible d'évaluer ainsi la stabilité bactérienne au niveau des forages et d'apprécier les évolutions au cours de l'embouteillage.



CONCLUSIONS

« L'eau ainsi est le regard de la terre, son appareil à regarder le temps. »
Paul Claudel (1868-1955) – L'oiseau noir dans le soleil levant.

Les objectifs de cette thèse sont d'explorer scientifiquement et techniquement le microbisme naturel de deux eaux minérales françaises et de répondre aux préoccupations des industriels, soucieux de mieux connaître leur produit.

Par conséquent, ce mémoire est écrit pour des minéraliers curieux, avec une partie « généralités » décrivant les notions de bases relatives aux eaux minérales ; pour les « rats de bibliothèques » qui entreprendraient de nouvelles recherches; pour le personnel technique avec des réflexions sur le développement de process et de modes opératoires applicables dans le laboratoire ou sur la chaîne d'embouteillage et enfin pour les scientifiques, désireux d'acquérir les données les plus récentes sur les risques, la qualité, l'hygiène et les aspects législatifs concernant les eaux minérales naturelles.

Malgré l'importance des eaux minérales sur le marché mondial, nos connaissances scientifiques sur sa composition biologique sont diffuses et reposent sur quelques postulats. Quoiqu'il en soit, l'eau est un élément simple qui renferme un monde microbien varié et complexe.

Nos travaux contribuent à une meilleure connaissance des microflore des eaux minérales, particulièrement sur les sources Vauban et Clos de l'Abbaye de la Société des Eaux Minérales Naturelles de Saint Amand (59732).

Des données générales sont reprises dans nos discussions et établissent par conséquent des liens entre la microflore de différentes eaux minérales commercialisées. Les dénombrements bactériens restent faibles au niveau du griffon, quelque u.f.c./ml et de l'ordre de 10^4 à 10^5 u.f.c./ml dans les eaux embouteillées. L'évolution de cette microflore concorde avec les études antérieures au sujet d'une augmentation post-embouteillage (5-7 jours), d'un maintien en survie des bactéries et des paramètres influents sur leur multiplication et cultivabilité. Les identifications rendent compte de la présence des genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, etc... conformément à la littérature. Cependant les caractères physico-chimiques de ce milieu aquatique limitent la diversité bactérienne propre à chaque source. Ainsi, il existe une "spécificité biologique" ou "empreinte" qui caractérisent la microflore de chacune des sources.

Je voudrais prévenir les jeunes gens contre l'attraction invincible des théories qui séduisent parce qu'elles simplifient et généralisent.
Ramon y Cajal

Pourtant, même si quelques grandes lignes ressortent de la bibliographie, il apparaît difficile de généraliser et d'édifier des modèles sur la microflore des eaux minérales. Comparée à la composition chimique, stable et simple, les caractéristiques microbiologiques évoluent sur des plans temporels (jours, années) et spatiaux/géographiques (sources, chaînes d'embouteillage, bouteilles). De plus, les conditions de stockage des eaux embouteillées (= conditions de croissance), l'origine des bactéries, leurs proportions relatives, et leur identité influent sur la composition mais également sur la physiologie des différentes classes de cette microflore.

L'observation de la microflore par la microscopie et les cultures sur gélose permettent de mettre en relief l'existence de processus d'adaptation des micro-organismes dans les eaux embouteillées. Ainsi, les résultats révèlent la présence de deux modèles de survie rencontrés dans cet environnement ; l'un correspond à une stratégie jeune-survie classiquement rapporté pour le genre *Pseudomonas*, l'autre à un état VNC désormais décrit pour de nombreuses bactéries à Gram négatif voire positive. Ces expériences montrent ainsi des populations méconnues, aux aspects morphologiques atypiques (accidents pariétaux), aux duplications avortées (étirement des cellules, polymorphisme), aux métabolismes singuliers (ganges, exosquelettes) et aux évolutions anarchiques. Nous montrons également l'inadéquation entre les modes opératoires normalisés et ceux requis pour optimiser la recherche de cellules viables cultivables, et/ou observer les populations bactériennes totales, viables non cultivables ou mortes dans ce type d'écosystème. A noter que l'apport d'azote organique d'un point de vue quantitatif mais principalement qualitatif joue un rôle important dans la croissance et la cultivabilité des micro-organismes rencontrés dans les eaux minérales ; l'oxygénation de l'eau, l'ajout de carbone et d'azote minérale ne semblent pas influencer le devenir de cette microflore.

L'étude des bactéries adsorbées sur les parois des bouteilles (PET, PVC) est rarement rapportée dans la bibliographie. Elle met en évidence de nouvelles difficultés dans l'évaluation des différentes classes microbiennes aquicoles. Elle rend compte également de la diversité des comportements physiologiques, métaboliques et morphologiques quant aux micro-niches écologiques et de nos lacunes en ce qui concerne les interactions entre les bactéries des eaux minérales et les emballages plastiques.

Je voudrais prévenir les jeunes gens contre l'attraction invincible des théories qui séduisent parce qu'elles simplifient et généralisent.

Ramon y Cajal

Dans un contexte sanitaire, l'intérêt des eaux minérales est sa pauvreté en nutriment. En effet, malgré la présence de souches multirésistantes, leur nombre et leur état physiologique limitent grandement leur effet sur l'Homme. De plus, ce milieu oligotrophe réduit considérablement les risques de contaminations, car il constitue un milieu adverse. Il convient donc lors de l'embouteillage, de conserver la nature originelle de l'eau pour éviter ou tout au moins limiter les altérations microbiologiques du produit fini.

Les textes officiels de la Communauté Européenne relatent d'une "pureté originelle" microbiologique (essentiellement propre au forage) des eaux minérales. Les bactéries constituant la population bactérienne des eaux embouteillées sont pourtant d'origines diverses, comme le montre nos travaux. La population apparaît comme autochtone (propre au forage), mais surtout allochtone (exogène) endémique (propre au site d'embouteillage) et accidentellement contaminante, avec un apport à plusieurs niveaux. De ce fait, il semble nécessaire d'établir une nouvelle définition relative à la microflore des eaux minérales et de légiférer sur le microbisme du griffon mais également sur celui du produit fini.

De la même manière, la législation ne prend pas en considération l'avancée des connaissances scientifiques (exemple: viabilité/cultivabilité) et ne tient pas compte des particularités de l'eau, à mi-chemin entre l'alimentaire et l'environnement.

Cette multitude de caractéristiques doit empêcher la banalisation de la population microbienne aquicole par le législateur, l'entrepreneur et le consommateur.

Nos résultats confortent le bien fondé d'un contrôle microbiologique quotidien et exigent une rédaction sérieuse et un suivi drastique des "bonnes pratiques d'embouteillage".

Les méthodes d'investigations rapportées à la fin de ce manuscrit s'organisent dans ce sens. Il est primordiale de concevoir les outils de demain pour connaître, étudier, caractériser et suivre ce monde microbien pour appréhender des incidents technologiques, des accidents environnementaux, etc... dans un contexte "Qualité" de plus en plus omniprésent.

Les méthodes directes et rapides détaillées ici, répondent aux exigences industrielles: fiabilité, reproductibilité, sensibilité et rapidité. Deux d'entre elles utilisent la microscopie à épifluorescence couplée à l'analyse d'image; l'une s'intéresse aux propriétés d'élongation spécifiques des micro-organismes selon leur profil de résistance aux (fluoro)quinolones, l'autre, aux colorants spécifiques, marqueurs de viabilité, de respiration et d'intégrité

Je voudrais prévenir les jeunes gens contre l'attraction invincible des théories qui séduisent parce qu'elles simplifient et généralisent.

Ramon y Cajal

membranaire. La troisième méthode s'oriente avec l'aide d'une chromatographie phase-gaz couplée à un spectromètre de masse vers les acides gras bactériens, marqueurs de stabilité, de stress et caractères d'identification de la population bactérienne des eaux minérales. Ces méthodes sont spécifiques du "vivant", aisément applicables aux échantillons d'eaux, mais surtout, rendent compte de la plus large proportion microbienne dans ce type d'eau.

Dans les perspectives de recherche, il semble intéressant d'effectuer sur le même modèle les expériences sur d'autres eaux minérales au niveau du griffon et en bouteille. La base de données obtenue permettrait alors des études comparatives, même au-delà d'une simple analyse microbiologique (nombre, identification, viabilité, cultivabilité,...). Des essais de corrélations entre les sites, le type d'embouteillage, la géologie, l'âge de l'eau, etc., pourraient être entrepris. Une meilleure compréhension des facteurs influant sur cet écosystème serait obtenu. De même, une « fiche d'identité » de la spécificité biologique des eaux minérales serait établis au même titre que la classique nature physico-chimique de ces eaux minérales.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

« *Ne jette pas de pierre dans la **source**, où tu t'es desaltérée.* »

Talmud – Ibid. baba Kamma –92b.

Abbas, C.A. and Card, G.L. 1980. The relationship between growth temperature fatty acids composition and the physical state and fluidity of membrane lipids in *Yersinia enterocolitica*. *Biochimica and Biophysica Acta* **602**, 469-476.

Abe, F. 1998. Hydrostatic pressure enhances vital staining with carboxyfluorescein or carboxy dichlorofluorescein in *Saccharomyces cerevisiae*: efficient detection of labeled yeasts by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1139-1142.

Abraham, W.-R., Meyer, H., Lindholst, S., Vancanneyt, M. and Smit, J. 1997. Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacter sensu lato*, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *Systematic of Applied Microbiology* **20**, 522-539.

Abu Hatab, M.A. and Gaugler, R. 1997. Growth-mediated variations in fatty acids of *Xenorhabdus* sp. *Journal of Applied Microbiology* **82**, 351-358.

Adams, J.C., Lytle, M.S., Dickman, D.G. and Bressler, W.R. 1991. Use of direct viable count methodology with ozonation in drinking water. *Ozone Science Engineering* **13**, 1-10.

Adams, R.L. and Russel, N.J. 1992. Interactive effects of salt concentration and temperature on growth and lipid composition in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*. *Canadian Journal of Microbiology* **38**, 823-827.

Afifi, S.A. and Muller, G. 1975. Fluoreszenzbakterioskopie, eine direkte methode zur bakteriologischen Lebensmitteluntersuchung. *Die Nahrung* **19**, 557-567.

Al Jebouri, M.M. 1985. A note on antibiotic resistance in the bacterial flora of raw sewage and sewage-polluted river Tigris in Mosul, Iraq. *Journal of Applied Bacteriology* **58**, 401-405.

Albertson, N.H., Nyström, T. and Kjelleberg, S. 1990. Starvation-induced modulations in binding protein-dependent glucose transport by the marine *Vibrio* sp. S14. *FEMS Microbiology Letters* **58**, 205-209.

Alexander, Ismail, F., Jackman, P.S.H and Noble, W.C. 1984. Finger printing *Acinetobacter* strains from clinical sources by numerical analysis of electrophasic protein patterns. *Journal of Medical Microbiology* **18**, 55-64.

Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F.-O., Wille, A. and Psenner, R. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a

high mountain lake by *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2138-2144.

Allen, D.A., Austin, B. and Colwell, R.R. 1977. Antibiotic resistance patterns of metal tolerance bacteria isolated from an estuary. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **12**, 545-547.

Al-Rubeai, M. and Emery, A.N. 1996. Flow cytometry applications in cell culture. Marcel Dekker Inc. ed.

Altmann, G. and Bogokovsky, B. 1971. *In vitro* sensitivity of *Flavobacterium meningosepticum* to antimicrobial agents. *Journal of Medical Microbiology* **4**, 296-299.

Amako, K., Meno, Y. and Takade, A. 1988. Fine structures of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *Journal of Bacteriology* **170**, 4960-4962.

Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**, 762-770.

Amann, R.I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. and Stahl, D.A. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 614-623.

Amy, P.S., Haldeman, D.L., Ringelberg, D., Hall, D.H. and Russell, C. 1992. Comparison of identification systems for classification of bacteria isolated from water and endolithic habitats within the deep subsurface. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3367-3373.

Amy, P.S., Pauling, C. and Morita, R.Y. 1983. Recovery from nutrient starvation by marine *Vibrio* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1685-1690.

Anderson, R.L., Holland, B.W., Carr, J.K., Bond, W.W. and Favero, M.S. 1990. Effect of disinfectants on *Pseudomonads* colonization on the interior surface of PVC pipes. *American Journal of Public Health* **80**, 17-21.

Anonymous. 1980. Directive du conseil du Juillet 1980 relative au rapprochement des législations des états membres concernant l'exploitation et la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles (80/777/CEE). *Journal Officiel des Communautés Européennes* **L229**, 1-10.

Anonymous. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th ed. pp. 827-917. Washington DC: *American Public Health Association*.

Anonymous. 1996. Technical recommendations for *in vitro* susceptibility testing. Standard n°4 : method of determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in liquid media for fast-growing aerobic bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **2**, 511-525.

Anstey, N.M., Currie, B.J. and Withnall, K.M. 1991. Community-acquired *Acinetobacter pneumonia* in northern territory of Australia. *Clinical Infectious Disease* **14**, 83-91.

Arana, I., Muela, A., Iriberry, J., Egea, L. and Barcina, I. 1992. Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3903-3907.

Armstrong, J.L., Shigeno, D.S., Calomiris, J.J. and Seidler, R.J. 1981. Antibiotic resistant bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 277-281.

Arneborg, N., Salskov-Iversen, A.S. and Mathiasen, T.E. 1993. The effect of growth rate and other growth conditions on the lipid composition of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**, 353-357.

Arturo-Schaan, M., Sauvager, F., Mamez, C., Gougeon, A. and Cormier, M. 1996a. Use of peracetic acid as a disinfectant in a water-treatment plant: effect on the plasmid contents of *Escherichia coli* strains. *Current Microbiology* **32**, 43-47.

Arturo-Schaan, M., Tamahai-Shacoori, Z., Thomas, D. and Cormier, M. 1996b. Variations in R-plasmid DNA concentrations of *Escherichia coli* during starvation in sewage and brackish waters. *Journal of Applied Bacteriology* **80**, 117-123.

Atkinson, C.F., Jones, D.D. and Gauthier, J.J. 1997. Microbial activities during composting of pulp and paper-mill primary solids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**, 519-525.

Auby, J.F. 1994. Les eaux minérales. Eds "que sais-je?".

Autio, K., and Mattila-Sandholm, T. 1992. Detection of active yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) in frozen dough sections. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2153-2157.

Awong, J., Bitton, G. and Chaudhry, G.R. 1990. Microcosms for assessing survival or genetically

engineered micro-organisms in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 977-983.

Awong, J.G. Bitton and Koopman, B. 1985. ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of *Actinomycete* foams. *Water Research* **22**, 349-353.

Baath, E., Frostegard, A. and Fritze, H. 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 4026-4031.

Baker, J.H. and Farr, I.S., 1997. Origins, characterization and dynamics of suspended bacteria in two chalk streams. *Archives Hydrobiology* **80**, 308-326.

Baker, R.M., Singleton, F.L. and Hood, M.A. 1983. Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 930-940.

Bakhoo, M. and Herbert, R.A. 1979. The effects of temperature on the fatty acid and phospholipid composition of four obligatory psychrophilic *Vibrio* sp. *Archives Microbiology* **121**, 121-127.

Bakken, L.R. and Olsen, R.A. 1996. Dwarf cell in soil. A result of starvation of "normal" bacteria, on a separate population? Department of Microbiology, Agricultural University of Norway **4**, 561-566.

Baleux, B. and Got, P. 1996. Apport de l'observation microscopique couplée à l'analyse d'image dans l'évaluation de la qualité bactériologique des eaux: approche cellulaire globale. *Techniques des Sciences de l'eau* **91**, 430-436.

Balkwill, D.L. 1989. Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in south Carolina. *Geomicrobiology Journal* **7**, 33-52.

Balkwill, D.L. and Bone, D.R. 1997. Identity and diversity of micro-organisms cultured from subsurface environments. In *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface* ed. Amy, P.S. and Haldeman, D.L. pp. 105-117. CRC Press LLC.

Balkwill, D.L. and Ghiorse, W.C., 1985. Characterization of bacteria subsurface associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 580-588

- Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K. and Thomas, J.M. 1989. Vertical and horizontal variations in the physiological diversity of the aerobic chemoheterotrophic bacterial microflora in deep Southeast coastal plain subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1058-1065.
- Balkwill, D.L., Leach, F.R., Wilson, J.T., Mc Nabb, J.F. and White, D.C. 1988. Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface aquifer sediments. *Microbiological Ecology* **16**, 73-84.
- Balkwill, D.L., Reeves, R.H., Drake, G.R., Reeves, J.Y., Crocker, F.H., King, M.B. and Boone, D.R. 1997. Phylogenetic characterization of bacterial subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiology Reviews*
- Barcellona, M.L., and Gratton, E.1990. The fluorescence properties of a DNA probe. *European Biophysics Journal* **17**, 315-323.
- Barcellona, M.L., Favilla, R., Berger, J.V., Avitabile, M., Ragusa, N. and Masotti, L. 1986. DNA-4',6-diamidine-2-phenylindole interactions: a comparative study employing fluorescence and ultraviolet spectroscopy. *Archives Biochemistry Biophysics* **250**, 48-53.
- Barcina, I., Arana, I., Iriberry, J. and Egea, L., 1986. Influence of light and natural microbiota of the Butron river on *Escherichia coli* survival. *Antonie Van Leeuwenhoek* **52**, 555-566.
- Barcina, I., Arana, I., Santorum, P., Iriberry, J. and Egea, L. 1995. Direct viable count of Gram positive and Gram negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. *Journal of Microbiological Methods* **22**, 139-150.
- Barcina, I., Gonzalez, J.M., Iriberry, J. and Egea, L. 1990. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 189-198.
- Barcina, I., LeBaron, P. and Vives-Rego, J. 1997. Survival of allochthonous bacteria in aquatic system: a biological approach. *FEMS Microbiology Ecology* **23**, 1-9.
- Barillier, A. and Garnier, J. 1993. Influence of temperature and substrate concentration on bacterial growth yield in Seine River water batch cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1678-1682.

- Bedard, L.A., Drapeau, A.J., Kasatiya, S.S. and Plante, R. 1982. Plasmides de résistance aux antibiotiques chez les bactéries isolées d'eaux potables. *Eau Que* **15**, 59-66.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H. and Atlas, R.M. 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 597-600.
- Bell, J.B., Elliott, G.E. and Smith, D.W. 1983. Influence and urbanization on selection of multiple resistance in faecal coliform populations. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 227-232.
- Beloin, R.M., Sinclair, J.L. and Ghiorse, W.C. 1998. Distribution and activity of micro-organisms in subsurface sediments of a pristine study site in Oklahoma. *Microbiology Ecology* **16**, 85-97.
- Bercovier, H., Resnick, M., Kornitzer, D. and Levy, L. 1987. Rapid method for testing drug-susceptibility of mycobacteria sp. and Gram-positive bacteria using rhodamine 123 and fluorescein diacetate. *Journal of Microbiological Methods* **7**, 139-142.
- Bergogne-Bérézin, E. 1994. *Acinetobacter* sp., saprophytic organisms of increasing pathogenic importance. *Zentralblatt für Bakteriologie* **281**, 389-405.
- Bergogne-Bérézin, E. and Joly-Guillou, M.L. 1985. An underestimated nosocomial pathogen, *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **16**, 535-538.
- Berube, L.R. and Hollingsworth, R.I. 1995. Membrane lipid alkyl chain motional dynamics is conserved in *Sarcina ventriculi* despite pH-induced adaptive structural modifications including alkyl chain tail to tail coupling. *Biochemistry* **34**, 12005-12011.
- Bianchi and Giuliano, L. 1996. Enumeration de bacteria viable in the marine pelagic environment. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 174-177.
- Bird, D.F. and Kell, J. 1993. Protozoan grazing and the size-activity structure of limnetic bacterial communities. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* **50**, 370-380.
- Bischofberger, T., Cha, S.-K., Schmitt, R., König, B., and Schmidt-Lorenz, W. 1990. The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. *International Journal of Food Microbiology* **11**, 51-72.
- Bitton, G. and Koopman, B. 1982. Tetrazolium reduction-malachite green method for assessing the

variability of filamentous bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 964-966.

Bizet, C. and Bizet, J. 1995. Sensibilité comparée de *Ochrobactrum anthropi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis denitrificans* subsp. *denitrificans*, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosidans* et *Bordetella bronchiseptica* vis-à-vis de 35 antibiotiques dont 17 β -lactamines. *Pathological Biology* **43**, 258-263.

Biziagos, E., Passagot, J., Cance, J.M. and Deloince, R. 1988. Long term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral Water. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 2705-2709.

Blake, P.A., Rosenberg, M.L., Florencia, J., Costa, J.B., Quintino, L. and Gangarosa, E.J. 1977. Cholera in Portugal. 1974. II. Transmission by bottled mineral water. *American Journal of Epidemiology* **105**, 344-348.

Blenkinsopp, S.A. and Lock, M.A. 1990. The measurement of electron transport system in river biofilm. *Water Research* **24**, 441-445.

Bobbie, R.J. and White, D.C. 1980. Characterization of benthic microbial community structure by high resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 1212-1222.

Bochner, B.R. 1994. The Biolog microstation system and general procedures for identifying environmental bacteria and yeast. Biolog, Inc., pp 13-51.

Bodnaruk, P.W. and Golden, D.A. 1996. Influence of pH and incubation temperature on fatty acid composition and virulence factors of *Yersinia enterocolitica*. *Food Microbiology* **13**, 17-22.

Boe, B and Gjerde, J. 1980. Fatty acids patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. *Journal of General Microbiology* **116**, 41-49.

Bone, T.L. and Balkwill, D.L. 1988. Morphological and cultural comparison of micro-organisms in surface soil and subsurface sediments at a pristine study site in Oklahoma. *Microbiology Ecology* **16**, 49-64.

- Bonilla, H.F., Zarins, L.T., Bradley, S.F. and Kauffman, G.A. 1996. Susceptibility of ciprofloxacin-resistant staphylococci and enterococci to trovafloxacin. *Diagnostic Microbiological Infectious Disease* **26**, 17-21.
- Bovill, R.A. and McKey, B.M. 1997. Resuscitation of "non-culturable" cells from aged cultured of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* **143**, 1575-1581.
- Bovill, R.A., Shallcross, J.A. and Mackey, B.M. 1994. Comparison of the fluorescent redox dye 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride with p-iodonitrotetrazolium violet to detect metabolic activity in heat-stressed *Listeria monocytogenes* cells. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 353-358.
- Boye, E. and Lobner-Olesen, A. 1991. Bacterial growth control studied by flow cytometry. *Research Microbiology* **142**, 131-135.
- Boylan, C.W. 1973. Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation. *Journal of Bacteriology* **113**, 33-37.
- Brauns, L.A., Hudson, M.C. and Oliver, J.D. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and non culturable *Vibrio vulnificus* cells. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2651-2655.
- Breierova, E., Stratilova, E. and Sajbidor, J. 1996. Production of extracellular polymers by yeast-like genera *Dipodascus* and *Dipodascopsis* under NaCl stress. *Folia Microbiology* **41**, 257-263.
- Breschel, T.S. and Singleton, F.L. 1992. Use of the API rapid NFT system for identifying nonfermentative and fermentative marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 21-26.
- Breuil, C., Novitsky T.J. and Kushner, D.J. 1975. Characteristics of a facultatively psychrophilic *Acinetobacter* species isolated from river sediment. *Canadian Journal of Microbiology* **21**, 2103-2108.
- Brown, B.J. and Leff, L.G. 1996. Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API 20 E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2183-2185.

- Brown, J.L., Ross, T., McMeekin, T.A. and Nichols, P.D. 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropan fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 163-173.
- Buchrieser, C. and Kaspar, C.W. 1993. An improved direct viable count for the enumeration of bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology* **20**, 227-237.
- Burton, N.F., Day, M.J. and Bull, A.T. 1982. Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a south Wales river. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 1026-1029.
- Busse, H.-J., Denner, E.B.M. and Lubitz, W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic. *Journal of Biotechnology* **47**, 3-38.
- Buswell, C.M., Merlino, Y.M., Lawrence, L.M., Mc Guiggan, J.T.M., Marsh, P.D., Keevil, C.W. and Leach, S.A. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter sp.* in water and aquatic environments and their detection by immunofluorescent antibody and RNA staining. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 733-741.
- Buttiaux, R. 1960. La surveillance bactériologique des eaux minérales en bouteilles et en boîtes. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille* **11**, 23-38.
- Buttiaux, R. and Boutier, A. 1960. Comportement des bactéries autotrophes dans les eaux minérales conservées en récipients hermétiquement clos. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille* **11**, 43-54.
- Buyer, J.S. and Drinkwater, L.E. 1997. Comparison of substrate utilization assay and fatty acid analysis of soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* **30**, 3-11.
- Byrd, J.J. and Colwell, R.R. 1990. Maintenance of plasmids pBR322 and pUC8 in nonculturable *Escherichia coli* in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2104-2107.
- Byrd, J.J., Xu, H.-S. and Colwell, R.R. 1991. Viable but non culturable bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 875-878.
- Cabral, J.P.S. 1994. Survival and chemical alterations in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 starved in buffer. *Microbios* **78**, 47-53.

- Cabral, J.P.S. 1995. Viability and respiratory activity of *Pseudomonas syringae* cells starved in buffer. *Canadian Journal of Microbiology* **41**, 372-377.
- Cahoon, E.B., Mills, L.A. and Shanklin, J. 1996. Modification of the fatty acid composition of *Escherichia coli* by coexpression of a plant acyl-acyl carrier protein desaturase and ferredoxin. *Journal of Bacteriology* **178**, 936-939.
- Campbell, C.D., Grayston, S.J. and Hirst, D.J. 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* **30**, 33-41.
- Campeau, R.C., Gulli, L.F. and Graves, J.F. 1996. Drug resistance in Detroit river Gram-negative bacilli. *Microbios* **88**, 205-212.
- Camper, A.K., Hayes, J.T., Shirman, P.J., Jones, W.L., and Cunningham, A.B. 1993. Effects of mobility and absorption rate coefficient on transport of bacteria through saturated porous media. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3455-3462.
- Carratu, L., Franceschelli, S., Pardini, C.L., Kobayashi, G.S., Horvath, I., Vigh, L. and Maresca, B. 1996. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. National Academy Science USA*. **93**, 3870-3875.
- Carter, E.A., Paul, F.E. and Hunter, P.A. 1993. The cytometric evaluation of antifungal agents. In *Flow Cytometry in Microbiology* ed. Lloyd, D. pp. 111-120.
- Chao, W.L. and Feng, R.L. 1990. Survival of genetically engineered *Escherichia coli* in natural soil and river water. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 319-325.
- Chapelle, F.H. and Lovley, D.R. 1990. Rates of microbial metabolism in deep coastal plain aquifers. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1865-1874.
- Chapelle, F.M., Morris, J.T., McMahon, P.B. and Zelibor, J.L. 1988. Bacterial metabolism and the ¹³C composition of ground water, floridan aquifer, south Carolina. *Geology* **16**, 117-121.
- Chery, L. 1992. Etude du temps de transit de la Source du Clos de l'Abbaye, Saint-Amand-les-Eaux (59). BRGM. Service géologique national, Département Géochimie, R 35995 GCH-SGN-92.

- Chmielewski, R.A.N. and Frank, J.F. 1995. Formation of viable but nonculturable *Salmonella* during starvation in chemically defined solutions. *Letters in Applied Microbiology* **20**, 380-384.
- Chrzanowski, T.H., Crotty, R.D., Hubbard, J.G. and Welch, R.P. 1984. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microbiology Ecology* **10**, 179-185.
- Clegg, C.D., Van Elsas, J.D., Anderson, J.M. and Lappin-Scott, H.M. 1996. Survival of parental and genetically modified derivatives of a soil isolated *Pseudomonas fluorescens* under nutrient-limiting conditions. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 19-26.
- Coallier, J., Lafrance, P., Duchesne, D. and Lavoie, J. 1989. La recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau potable. *Sciences et Techniques de l'Eau* **22**, 63-72
- Coallier, J., Prevost, M., Rompré, A. and Duschene, D. 1994. The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. *Canadian Journal of Microbiology* **40**, 830-836.
- Cohen, C.Y. and Sahar, E. 1989. Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 1250-1256.
- Cohen, S.D. 1984. Detection of mycelium and oospores of *Phytophthora Megasperma* forma specialis *Glycinea* by vital stains in soil. *Mycologia* **76**, 34-39.
- Colding, H., Bangsborg, J., Fiehn, N.E., Bennekov, T. and Bruun, B. 1994. Robotyping for differentiating *Flavobacterium septicum* isolates from clinical and environmental sources. *Journal of Clinical Microbiological* **32**, 501-505.
- Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huy, S.A. and Palmer, L.M. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment implications for release of genetically engineered micro-organisms. *Biotechnology* **3**
- Cook, H. 1988. Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. *In: physiological regulation of membrane fluidity*, P. 107-212. Liss, A.R., Ed., Academic Press, London.

- Cook, K.L. and Garland, J.L. 1997. The relationship between electron transport activity as measured by CTC reduction and CO₂ production in mixed microbial communities. *Microbial Ecology* **34**, 237-247.
- Cooke, M.D. 1976. Antibiotic resistance in coliform and faecal coliform bacteria from natural waters and effluents. *N.Z. Journal Marine Freshwater Research* **10**, 391-397.
- Coroler, L., Elomari, M., Hoste, B., Gillis, M., Izard, D. and Leclerc, H. 1996. *Pseudomonas rhodesiae* sp. nov., a new species isolated from mineral waters. *Systematic of Applied Microbiology* **19**, 600-607.
- Cottet, J. 1979. Rapport de la commission N°XI (climatisme-thermalisme-eaux minérales). Sur la demande d'autorisation d'exploitation, comme eau minérale naturelle telle qu'à l'émergence, après transport à distance par canalisation et traitement de l'eau de la source de "Petit-Clos", située à St Amand les Eaux (Nord).
- Craun, G.F. 1986. Waterborne giardiasis in the United States 1965-1984. *Lancet* **2**, 513-514.
- Craun, G.F. 1993. Epidemiology studies of water disinfectants and disinfection by products. *In: Safety of water disinfection: balancing chemical & microbial risks*, ILSI Press, Washington, pp. 277-301.
- Cullen, J., Philipp, M.C. and Shipley, G.G. 1971. The effects of temperature on the composition and physical properties of the lipids of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biochemistry* **125**, 733-742.
- Cunha, B.A., Hussain Qadri, S.M, Ueno, Y., Walters, E.A. and Domenico, P. 1997. Antibacterial activity of trovafloxacin against nosocomial Gram + and Gram - isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**, 29-34.
- Curtis, T.P., Mara, D.D. and Silva, S.A. 1992. Influence of pH, oxygen, and humic substances on ability of sunlight to damage faecal coliformes in waste stabilization pond water. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1335-1343.
- Daboussi F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D. and Leclerc, H. Taxonomic study of bacteria isolated from Lebanese spring waters: proposal of *Pseudomonas cedrella* sp. nov., and *Pseudomonas orientalis* sp. nov. *Soumis Research Microbiology*.

- Daboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D. and Leclerc, H. 1998. A numerical study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from three Lebanese spring waters. *Journal Européen d'Hydrobiologie* **28**, 325-338.
- Daboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D. and Leclerc, H. *Pseudomonas libaniensis* sp. nov., a new species of the genus *Pseudomonas* isolated from Lebanese spring waters. Soumis *International Journal of Systematic Bacteriology*.
- Daley, R.J., 1979. Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria : uses, limitations, and comparative accuracy, p. 29-45. In J.W. Costerton and R.R. Colwell (ed.). *Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity, and Ecology*. ASTM STP 605. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Datta, N. 1969. Drug resistance and R factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital. *Bromatology Medical Journal* **2**, 407-411.
- Davey, H.M., Kaprelyant, A.S. and Kell, DB. 1993. Flow cytometry analysis, using rhodamine 123, of *Micrococcus luteus* at low growth rate in chemostat culture. In *Flow Cytometry*. Ed Lloyd, D. pp. 83-93. London: Springer Verlag.
- Davies, C.M. and Evison, L.M. 1991. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 265-274.
- Davies, C.M., Apte, S.C. and Peterson, S.M. 1995. B-D-galactosidase activity of viable, non-culturable coliform bacteria in marine waters. *Letters in Applied Microbiology* **21**, 99-102.
- Dawson, M.P., Humphrey, B.A. and Marshall, K.C. 1981. Adhesion, a tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation. *Current Microbiology* **6**, 195-198.
- De Felip, G., Tuti, L. and Iannicelli, P. 1976. Osservazioni comparative sull andamento della flora microbia delle acque minerali naturali confezionate in vetro "PVC" e "tetrabrik". *Annali Istituto Superiori Sanita* **12**, 203-209.
- De la Rosa Jorge, M.C., Diaz Alonfo, F., Mosso Romeo, M.A. and De Iriarte, E. 1983. Microbiologia de las aguas minero-medicales de Alhama de Aragon. *Annales de la Real Academia de Farmacia* **49**, 381-388.
- De Ley, J. 1992. The proteobacteria: ribosomal RNA cistron similarities and bacterial taxonomy,

- pp.2109-2140. In *The Prokaryotes*, A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer, eds. 2nd ed., vol.2, Springer Verlag, New-York.
- De Los Angeles Mosso, M., De La Rosa, M.D.C., Vivar, C., Medina, M.D.R. 1994. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of the thermal springs in Spain. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 370-381.
- De Vicente, A., Avilés, M., Codina, J.C., Borrego, J.J. and Romero, P. 1990. Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 625-632.
- De Vos, P. and De Ley, J. 1983. Intra- and intergeneric similarities of cistrons. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**, 487-509.
- De Vos, P., Kersters, K., Falsen, E., Pot, B., Gillis, M., Segers, P. and De Ley, J. 1985. *Comamonas* David and Park 1962 gen. nov. rev. emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 443-453.
- Dees, S.B., Hollis, D.G., Weaver, R.E. and Moss, C.W. 1983. Cellular fatty acid composition of *Pseudomonas marginata* and closely associated bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **18**, 1073-1078.
- Del Vecchio, V. and Fischetti, M. 1972. Ardamento nel tempo della flora saprofitica presente in acque minerali: confronto fra contenitori di vetro e contenitori di plastica. *Nuovi Annual Igiene Microbiologia* **23**, 277-285.
- Delattre, J.M. 1986. Le contrôle bactérien rapide des eaux par épifluorescence. *Journal Français d'Hydrobiologie* **17**, 59-70.
- Delattre, J.M., Hernandez, J.F., and Oger, C. 1988. Evolution de la microflore totale d'eaux souterraines en réseau et en bouteilles. *Science des Aliments*, **8** n° hors série IX, 163-172.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. and Pace, N.R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* **243**, 1360-1363.
- Diaper, J.P. and Edwards, C. 1994. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 221-228.

- Dieffenbach, R., Heipieper, H.J. and Keweloh, H. 1992. The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 : evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**, 382-387.
- Dodd, C.E.R. 1990. Detection of sites of microbial growth in food by cryosectioning and light microscopy. *Food Science Technology Today* **4**, 180-182.
- Dodd, C.E.R. and Waites, W.M. 1992. Development of microscopic techniques for examining microbial growth in situ in food ecosystems. *Journal of Applied Bacteriology Symposium* **73**, 148-154.
- Doi, 1972. Regulatory events during the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **17**, 370-378.
- Dowling, N.J.E., Widdel, F. and White, D.C. 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid biomarkers of acetate oxidizing sulphate reduces and other sulphide-forming bacteria. *Journal of General Bacteriology* **132**, 1815-1825.
- Drici-Cachon, Z., Cavin, J.F. and Diviès, C. 1996. Effect of pH and age of culture on cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 331-334.
- Ducluzeau, R. and Raibaud, P. 1979. *Ecologie microbienne du tube digestif*, Masson ed., Paris.
- Ducluzeau, R., Bochand, J.M., and Dufresne, S. 1976a. La microflore autochtone de l'eau minérale: nature, caractères physiologiques, signification hygiénique. *Médecine et Nutrition* **XII**-N°2.
- Ducluzeau, R., Dufresne, S. and Bochand, J.M. 1976b. Inoculation of the digestive tract of axenic mice with the autochthonous bacteria of mineral water. *European Journal of Applied Bacteriology* **2**, 127-134.
- Ducluzeau, R., Hudault, S and Galpin, J.V. 1976c. Longevity of various bacterial strains of intestinal origin in gas-free mineral water. *European Journal of Applied Microbiology* **3**, 227-236.
- Ducluzeau, R., Hudault, S. and Galpin, J.V. 1977. Influence du conditionnement sur la croissance d'une souche autochtone de *Pseudomonas fluorescens* dans l'eau minérale de la Grande Source de Vittel. *Annales de l'Institut Hydrologie Clinique. Journées d'hydrologie de Nancy* N°sp, 77-90.

- Ducluzeau, R., Nicolas, J.L., Galpin, J.V. and Raibaud, P. 1984. Influence of autochthonous bacteria on the longevity of *Escherichia coli* in bottled mineral water. *Science des Aliments* **4**, 585-594.
- Dufour, P., Torreton, J.P. and Colon, M. 1990. Advantages of distinguishing the active fraction in bacterioplankton assemblages: Some examples. *Hydrobiologia* **207**, 295-301.
- Duquino, H.H. and Rosemberg, F.A. 1987. Antibiotic-resistant *Pseudomonas* in bottled drinking water. *Canadian journal of microbiology* **33**, 286-289.
- Edlund, A., Nichols, P.D. and White, D.C. 1985. Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio* species. *Journal of Lipid Research* **26**, 982-988.
- Elomari, M., Coroler, L., Hoste, B., Gillis, M., Izard, D. and Leclerc, H. 1996. DNA relatedness among strains of *Pseudomonas* isolated from mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 1138-1144.
- Elomari, M., Coroler, L., Izard, D. and Leclerc, H. 1995. A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral water. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 71-81.
- El-Zanfaly, H.T. 1990. The concepts of heterotrophic bacteria limit in bottled water as quality criteria. *Rivista Italiana D'Igiene* **50**, 440-446.
- Evina, E. 1992. Le guide du buveur d'eau. Eds SOLAR.
- Fagerbakke, K.M., Heldal, M. and Norland, S. 1996. Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulphur, and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbiology Ecology* **10**, 15-27.
- Favilla, R., Stecconi, G., Cavatorta, G. and Mazzini, A. 1993. The interaction of DAPI with phospholipid vesicles and micelles. *Biophysics Chemistry* **46**, 217-226.
- Federle, T.W. 1986. Microbial distribution in soil- new techniques, p. 493-498. In F.Megusar and M. Gantar (ed.), Perspectives in microbial ecology. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, Slovenia.
- Fernandes, M.A., Jackman, P.J.H., Clark, S.A. and Gunard, S.R. 1988. Detection and quantification of micro-organisms in heterogeneous food stuff by image analysis. *CABIOS* **4**, 291-295.

- Fernandez-Astorga, A., Hijarrubia, M.J., Hernandez, M., Arana, I. and Sunen, E. 1995. Disinfectant tolerance and antibiotic resistance in psychrotrophic Gram-negative bacteria isolated from vegetables. *Letters in Applied Microbiology* **20**, 308-311.
- Fernandez-Astorga, A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J. and Barcina, I., 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 392-398.
- Ferreira, A.C., Morais, P.V. and Da Costa, M.S. 1994. Alterations in total bacteria, iodonitrophenyltetrazolium (INT)-positive bacteria, and heterotrophic plate counts of bottled mineral water. *Canadian Journal of Microbiology* **40**, 72-77.
- Ferreira, A.C., Morais, P.V., Gomes, C. and Da Costa, M.S. 1996. Computer-aided comparison of protein electrophoretic patterns for grouping and identification of heterotrophic bacteria from mineral water. *Journal of Applied Bacteriology* **80**, 479-486.
- Fewtrell, L., Kay, D., Wyer, M., Godfree, A. and O'Neill, D. 1997. Microbiological quality of bottled water. *Water Science Technology* **35**, 47-53.
- Findley, R.H., Trexler, M.B., Guckert, J.B. and White D.C. 1990. Laboratory study of disturbance in marine sediments: response of a microbial community. *Marine Ecology Programme Ser.* **62**, 121-133.
- Flardh, K. and Kjelleberg, S. 1994. Glucose upshift of carbon-starved marine *Vibrio* sp. Strain S14 causes amino acid starvation and induction of the stringent response. *Journal of Bacteriology* **176**, 5897-5903.
- Fleet, G.H. and Mann, F. 1986. Microbiology of natural mineral water: an overview with data on Australian waters. *Food Technology in Australia* **38**, 106-110.
- Flint, K.P. 1987. The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *Journal of Applied Bacteriology*. **63**, 261-270.
- Fontes, D.E., Mills, A.L., Hornberger, G.M. and Herman, J.S. 1991. Physical and chemical factors influencing transport of micro-organisms through porous media. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2473-2481.

- Ford, A.S., Baltch, A.L., Smith, R.P. and Ritz, W. 1993. *In vitro* susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas* sp. to the new fluoroquinolones ciprofloxacin and PD 131628 and nine other antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**, 523-532.
- Franzmann, P.D., Patterson, B.M., Power, T.R., Nichols, P.D. and Davis, G.B. 1996. Microbial biomass in a shallow, urban aquifer contaminated with aromatic hydrocarbons analysis by phospholipid fatty acid content and composition. *Journal of Applied Bacteriology* **80**, 617-625.
- Fredrickson, H.L., Cappenberg, T.E. and de Leeuw, J.W. 1986. Polar lipid ester-linked fatty acid composition of Lake Vechten seston: an ecological application of lipid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **38**, 381-396.
- Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L., Drake, G.R., Romine, M.F., Ringelberg, D.B. and White, D.C. 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1917-1922.
- Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L., Zachara, J.M., Li, S.W., Brockman, F.J. and Simmons, M.A. 1991. Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep cretaceous sediments of the Atlantic coastal plain. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 402-411.
- Fredrickson, J.K. and Tullis-Onstott. 1996. Les micro-organismes de l'intérieur du globe. *Pour la Science* **230**, 90-95.
- French, G.L., Casewell, M.W., Roncoroni, A.J., Knoght, S. and Philipps, I. 1980. A hospital outbreak of antibiotic-resistant *Acinetobacter anitratus*: Epidemiology and control. *Journal of Hospital Infection* **1**, 125-131.
- Frostegard, A., Petersen, S., Baath, E. and Nielsen, T.H. 1997. Dynamics of a microbial community associated with manure hot spots as revealed by phospholipid fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2224-2231.
- Fry, J.C. and Talbot, Z.A. 1982. Viability of heterotrophic bacteria in freshwater. *Journal of General Microbiology* **128**, 2841-2850.
- Fujikawa, H., Wauke, T., Kusunoki, J., Noguchi, Y., Takahashi, Y., Ohta, K. and Itoh, T. 1997. Contamination of microbial foreign bodies in bottled mineral water in Tokyo, Japan. *Journal of Microbiology* **82**, 287-291.

- Fukunaga, N., Wada, M., Honjo, M., Setaishi, Y., Hayashinaka, N., Takada, Y. and Nishikawa, J. 1995. Effects of temperature and salt on lipid and fatty acid composition of a bacterium isolated from the bottom layer of lake Vanda, Antarctica. *Journal of General and Applied Microbiology* **41**, 191-205.
- Fulco, A.J. 1983. Fatty acid metabolism in bacteria. *Lipid Research* **22**, 133-160.
- Galdiereo, E., Donnarumma, G., de Martino, L., Marcatili, A., de l'Ero, G.C and Merone, A. 1994. Effect of low-nutrient seawater on morphology, chemical composition, and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Archives Microbiology* **162**, 41-47.
- Gannon, J., Tan, Y.H., Baveye, P. and Alexander, M. 1991. Effect of sodium chloride on transport of bacteria in a saturated aquifer material. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2497-2501.
- Gardner, P., Smith, D.H., Beer, H. and Moellering, R.C. 1969. Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community. *Lancet* **2**, 774-776.
- Garnier, J., Billen, G. and Servais, P. 1992. Physiological characteristics and ecological role of small and large sized bacteria in a polluted river (Seine, river France). *Archives Hydrobiology Limnology* **37**, 83-94.
- Gasol JM, Del Giorgio, P.A., Massana, R. and Duarte, C. 1995. Active versus inactive bacteria: Size-dependence in a coastal marine plankton community. *Marine Ecology Programme Ser.* **128**, 91-97.
- Gauthier, J.M., Flatau, G. and Bernard, P. 1981. Tolérance au plomb, au cadmium et au vanadium; et résistance aux antibiotiques chez les bactéries hétérotrophes de sédiments marins portuaires ou littoraux. *Revue internationale d'Océanographie Médicale* 63-64, 65-83.
- Gauthier, M.J., Flatau, G.N., Clément, R.L. and P.M., Munro. 1992. Sensitivity of *Escherichia coli* cells to seawater closely depends on their growth stage. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 257-262.
- Geesey, G.G. and White, D.C. 1990. Determination of bacterial growth and activity at solid-liquid interfaces. *Annual Review of Microbiology* **44**, 579-602.
- Geldreich, E.E. 1990. Bottled water: Microbial quality of alternative water supply. Congressional Workshop on Quality and Safety of Bottled Water, Washington DC.

- Geldreich, E.E., Nash, H.D., Reasoner, D.J. and Taylor, R.H. 1975. The necessity of controlling bacterial populations in potable waters: bottled and emergency water supplies. *Journal of the American Water Works Association* **67**, 117-124.
- Ghiorse, W., C. and Wilson, J.T. 1988. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Advances Applied Microbiology* **33**, 107-177.
- Gilardi, G.L. 1971. Antimicrobial susceptibility as a diagnostic aid in the identification of nonfermenting Gram-negative bacteria. *Applied Microbiology* **22**, 821-823.
- Gillian, F.T. and Hogg, R.W. 1984. A method for the estimation of bacterial biomass and community structure in mangrove-associated sediments. *Journal of Microbiological Methods* **2**, 275-293.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature (London)* **345**, 60-63.
- Givskov, M., Eberl, L. and Molin, S. 1994. Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: two-dimensional electrophoretic analysis of starvation- and stress-induced proteins. *Journal of Bacteriology* **176**, 4816-4824.
- Godineau-Gauthey, N., Lesage, D., Tessier, F., Kollia, D. and Daguet, G.L. 1988. *Acinetobacter calcoaceticus* variété *anitratu*s ou *Acinetobacter baumannii*. Etude de la sensibilité aux antibiotiques chez 65 souches hospitalières. *Médecine et maladies infectieuses* **2**, 124-129.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R. and Hitchcock, H.L. 1994. Changes in fatty acid composition of various lipid components of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes. Potassium sorbate and incubation temperature. *Journal of Food Microbiology* **21**, 293-303.
- Gomes, C., Morais, V.P. and Da Costa, M.S. (1996) Polyphasic characterization of yellow colony-forming bacteria from bottled mineral water. *Proceedings of the 1st International Congress Mineral Waters & Soft Drinks Legislation, Quality and Production*. p. 251-258. Florence, Congress Centre.
- Gonzalez, C., Guttierrez, C. and Grande, T. 1987a. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 1120-1125.
- Gonzalez, C., Ramirez, C. and Pereda, M. 1987b. Multiplication and survival of *Pseudomonas aeruginosa* in uncarbonated natural mineral water. *Microbiologie Aliment Nutrition* **4**, 111-115.

- Görl, M. Sauer, J., Baier, T. and Forchhammer, K. 1998. Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7042: adaptation to long-term survival. *Microbiology* **144**, 2449-2458.
- Gourmelon, M., Gillard, J. and Pommepuy, M. 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in sea water: oxidative stress hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 105-112.
- Goverde, R.L.J., Kusters, J.G. and Huis in't Veld, J.H.J. 1994. Growth rate and physiology of *Yersinia enterocolitica*; influence of temperature and presence of the virulence plasmid. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 96-104.
- Grabow, W., Prozesky, O. and Smith, L. 1974. Drug-resistant coliforms call for a review of water quality standards. *Water research* **8**, 1-9.
- Grau, R. and De Mendoza, D.L. 1993. Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **8**, 535-542.
- Gribbon, I.T. and Barer, M.R. 1995. Oxidative metabolism in nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. **61**, 3379-3384.
- Grimont, P.A.D., Vancanneyt, M., Lefèvre, M., Vandemeulebroecke, K., Vauterin, L., Brosch, R., Kersters, K. and Grimont, F. 1996. Ability of Biolog and Biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the *Pseudomonads*. *Systematic of Applied Microbiology* **19**, 510-527.
- Groat, R.G., Schultz, J.E., Zychlinsky, E., Bockman, A. and Martin, A. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *Journal of Bacteriology* **486**-**493**.
- Guckert, J.B., Antworth, C.P., Nichols, P.D. and White, D.C. 1985. Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS microbiology Ecology* **31**, 147-158.
- Guckert, J.B., Hood, M.A. and White, D.C. 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*; increases in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 794-801.

Guckert, J.B., Nold, S.C., Boston, H.L. and White, D.C. 1992. Periphyton response in an industrial receiving stream: lipid-based physiological stress analysis and pattern recognition of microbial community structure. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* **49**, 2579-2587.

Guillot, E. and Leclerc, H. 1993. Biological specificity of bottled natural mineral waters: characterization by ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 292-298.

Haack, S.K., Garchow, H., Odelson, D.A., Forney, L.J. and Klug, M.J. 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2483-2493.

Haldeman, D.L. and Amy, P.S. 1994. Bacterial heterogeneity in deep subsurface tunnels at Rainer Mesa, Nevada Test Site. *Microbiology* **55**, 2017-2024.

Haldeman, D.L., Amy, P.S., White, D.C. and Ringelberg, D.B. 1994. Changes in bacteria recoverable from subsurface volcanic rock samples during storage at 4°C. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2697-2703.

Haldeman, P.S., Amy, D., Ringelberg, D.C., White, Garen, R.E. and Ghiorse, C. 1995. Microbial growth and resuscitation alter community structure after perturbation. *FEMS Microbiology Ecology* **17**, 27-38.

Hamamoto, T., Takata, N., Kado, T. and Horikoshi, K. 1994. Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of psychrophilic *Vibrio sp.* strain n°5710. *FEMS Microbiology Letters* **119**, 77-82.

Harvey, H.R., Fallon, R.D. and Patton, J.S. 1986. The effect of organic matter and oxygen on the degradation of bacterial membrane lipids in marine sediments. *Geochimica Cosmochimica Acta* **50**, 795-804.

Harvey, R.W., and Garabedian, S.P., 1991. Use of collad filtration theory in modelling movement of bacteria through a contaminated sandy aquifer. *Environmental Science Technology* **25**, 178-185.

Hassani, L., Imzlin, B. and Gauthier, M.J. 1992. Antibiotic resistant *Escherichia coli* from wastewater before and after treatment in stabilization ponds in the arid region of Marrakech, Morocco. *Letters in Applied Bacteriology* **15**, 228-231.

- Haugland, R.P. 1996. Assays for cells viability, proliferation and function. In *Handbook of fluorescent probes and research chemicals 6th Ed.* Ed. Spence M.T.Z. p. 365-398. Eugene: Molecular Probe Inc.
- Havelaar, A., Toorop-Bouma, A. and Medema, G. 1990. The occurrence and significance of *Aeromonas* in water with special reference to natural mineral water. *Rivista Italiana D'Igiene* **50**, 349-356.
- Hazeleger, W.C., Janse, J.D., Koenraad, P.M., Beumer, F.J., Rombouts, R.R. and Abee, T. 1995. Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2713-2719.
- Heijnen, C.E., Page, S. and Van Elsas, J.D. 1995. Metabolic activity of *Flavobacterium* strain P25 during starvation and after introduction into bulk soil and the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiology Ecology* **18**, 129-138.
- Heipieper, H.-J., Diefenbach, R. and Keweloh, H. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1847-1852.
- Heipieper, H.J., Meulenbelb, G., Van Oirschot, Q. and De Bont, J.A.M. 1996. Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acid in *Pseudomonas putida* S12. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2773-2777.
- Henderson, R.J., Millar, R.M., Sargent, J.R. and Jostensen, J.P. 1993. *Trans*-monoenoic and polyunsaturated fatty acids in phospholipids of a *Vibrio* species of bacterium in relation to growth conditions. *Lipids* **28**, 389-396.
- Henningsson, P.J. and Gudmestad, N.C. 1991. Fatty acid analysis of phytopathogenic coryneform bacteria. *Journal of General Microbiology* **137**, 427-440.
- Hicks, R., Amann, R.I. and Stahl, D.A. 1992. Dual staining of bacterioplankton with 4',6'-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S RNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2158-2163.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **33**, 1225-1228.

- Hobot, J.A., Carlemalm, E., Villiger, W. and Kellenberger, E. 1984. Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *Journal of Bacteriology* **160**, 143-152.
- Holmes, B., Pinning, C.A. and Dawson, C.A. 1986. A probability matrix for the identification of Gram-negative aerobic, non-fermentative bacteria that grow on nutrient agar. *Journal of general Microbiology* **132**, 1827-1842.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *In Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology 9th ed.* Ed. Hensyl, W.R. Williams & Wilkins, p. 131.
- Hood, M.A., Guckert, J.B., White, D.C. and Deck, F. 1986. Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 788-793.
- Hunter, P.R. 1993. The microbiology of bottled natural mineral waters. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 345-352.
- Hunter, P.R. and Burge, S.H. 1987. The bacteriological quality of bottled natural mineral waters. *Epidemiology and Infection* **99**, 439-443.
- Hunter, P.R. Burge, S.H. and Hornby, H. 1990. An assessment of the microbiological safety of the bottled mineral waters. *Rivista Italiana D'Igiene* **50**, 394-400.
- Hurst, C.J. 1991. Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process. *Bulletin of the World Health Organisation* **69**, 113-119.
- Hussong, D., Colwell, R.R., O'brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Weiner, R.M. and Burge, W.D. 1987. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Bio/Technology* **5**, 947-950.
- Huys, G., Kämpfer, P., Vancanneyt, M., Coopman, R., Janssen, P. and Kersters, K. 1997. Effect of the growth medium on the cellular fatty acid composition of *aeromonads*: consequences for the chemotaxonomic differentiation of DNA hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Journal of Microbiological Methods* **28**, 89, 97.
- Huys, G., Vancanneyt, M., Coopman, R., Janssen, P., Falsen, E., Altwegg, M. and Kersters, K. 1994. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies

and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 651-658.

Jacobsen, C.N., Rasmussen, J. and Jakobsen, M. 1997. Viability staining and flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of microbiology Methods* **28**, 35-43.

Jahnke, L.L. 1992. The effects of growth temperature on the methyl sterol and phospholipid fatty acid composition of *Methylococcus capsulatus* (Bath.). *FEMS Microbiology Letters* **93**, 209-212.

Jain, D.K., Stroes-Gascoyne, S., Providenti, M., Tanner, C. and Cord, I. 1997. Characterization of microbial communities in deep groundwater from granitic rock. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 272-283.

James, G.A., Korder, D.R., Calwell, D.E. and Costerton, J.W. 1995. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *Journal of Bacteriology* **177**, 907-915.

Jänse, J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic of Applied Microbiology* **14**, 335-345.

Jiang, X. and Chai, T.-J. 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1300-1305.

Joly-Guillou, M.L., Vallée, E., Bergogne-Bérézin, E. and Philippon, A. 1988. Distribution of beta-lactamases and phenotype analysis in clinical strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **22**, 597-604.

Jones, J.G. and Simon, B.M. 1975. An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *Journal of Applied Bacteriology* **39**, 317-329.

Jones, J.G., Gardner, S., Simon, B.M. and Pickup, R.W. 1986. Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the England lake district. *Journal of Applied Bacteriology* **60**, 443-453.

- Jones, K.H. and Senft, J.A. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal Histochemistry and Cytochemistry* **33**, 77-79.
- Jones, S.E., Ditner, S.A., Freeman, C., Whitaker, C.J. and Lock, M.A. 1989. Comparison of a new inorganic membrane filter (Anopore) with a track-etched polycarbonate membrane filter (Nuclepore) for direct counting of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 529-530.
- Joux, F. and LeBaron, P. 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3643-3647.
- Joux, F., LeBaron, P. and Trousselier, M. 1997a. Changes in cellular states of the marine bacterium *Deleya aquamarina* under starvation conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2686-2694.
- Joux, F., LeBaron, P. and Trousselier, M. 1997b. Succession of cellular state in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 65-76.
- Kalmbach, S., Manz, W. and Szewzyk, U. 1997. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4164-4170.
- Kämpfer, P., Blasczyk, K. and Auling, G. 1994. Characterization of *Aeromonas* genomic species by using quinone, polyamine, and fatty acid patterns. *Canadian Journal of Microbiology* **40**, 844-850.
- Kämpfer, P., Bark, K., Busse, H.-J., Auling, G. and Dott, W. 1992. Numerical and chemotaxonomy of polyphosphate accumulating *Acinetobacter* strains with high polyphosphate: AMP phosphotransferase (PPAT) activity. *Systematic of Applied Microbiology* **15**, 409-419.
- Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Böhringer, J., Wagner, M. and Aman, R. 1996. Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial Ecology* **32**, 101-121.
- Kaneda, T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiology Reviews* **55**, 288-303.

- Kaplan, L.A., Bott, T.L. and Bielicki, J.K. 1992. Assessment of [³H]thymidine incorporation into DNA as a method to determine bacterial productivity in stream bed sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3614-3621.
- Kaprelyants, A.S. and Kell, D.B. 1992. Rapid assessments of bacteria viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology* **72** : 410-422.
- Kaprelyants, A.S., Gottschal, J.C. and Kell, D.B. 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiology Review* **10**, 271-285.
- Karajina, M. and Gonul, S.A. 1991. Survival of *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* in spring water. *International Journal of Food Microbiology* **13**, 315-352.
- Kelch, W.J. and Lee, J.S. 1978. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria isolated from environmental sources. *Applied and Environmental Microbiology* **36**, 450-456.
- Kennedy, A.C. and Wollum, A.G. 1988. Enumeration of *Bradyrhizobium japonicum* in soil subjected to high temperature: comparison of plate count, most probable number and fluorescent antibody techniques. *Soil Biology Biochemistry* **20**, 933-937.
- Kepner, R. L., James, J. R. and Pratt, R.. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples : past and present. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 603-615.
- Kepner, R.L., Jr. and Pratt, J.R. 1993. Effects of sediments on estimates of bacterial density. *Trans. American Microscopy Society* **112**, 316-320.
- Khaware, R.K., Koul, A. and Prasad, R.1995. High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranefaciens*. *Biochemistry and Molecular Biology International* **35**, 875-880.
- Kieft, T., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B. and White, D.C. 1997. Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1531-1542.
- Kieft, T.L., Ringelberg, D.B. and White, D.C. 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3292-3299.

- Kieft, T.L., Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D.B. and White, D.C. 1997. Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1531-1542.
- Kim, C.W., Koopman, B. and Bitton, G. 1987. Effects of suspended solids concentration and filaments type on the toxicity of chlorine and hydrogen peroxide to bulking activated sludge. *Toxicity Assessment* **2**, 49-62.
- King, L.K. and Parker, B.C. 1988. A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1630-1631.
- Kjelleberg, S., Marshall, K.C. and Hermansson, M. 1985. Oligotrophic and copiotrophic marine bacteria-observation related to attachment. *FEMS Microbiology Ecology* **31**, 89-96.
- Kjelleberg, S. and Hermansson, M. 1984. Starvation induced effects on bacteria surface characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 497-503.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B.A. and Marshall, K.C. 1982. Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 1166-1172.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B.A. and Marshall, K.C. 1983. Initial phases of starvation and activity of bacteria at surface. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 978-984.
- Kjelleberg, S., Albertson, N., Flardh, K., Holmquist, L., Jouper-Jaan, A., Marouga, R., Ostling, J., Svenblad, B. and Weichart, D. 1993. How do non-differentiating bacteria adapt to starvation? *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**, 333-341.
- Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **25**, 415-420.
- Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Hydrobiologie* **102** : 117-122.
- Kolbel-Boekle, J., Anders, E. and Nehrka, A. 1988a. Microbial communities in the saturated groundwater environment. Diversity of the Microbial communities in a Pleistocene sand aquifer and their *in vitro* activities. *FEMS Microbiology Ecology* **16**, 31-48.

- Kolbel-Boekle, J., Tienken, B. and Nehrarn, A. 1988b. Microbial communities in the saturated groundwater environment. Methods of isolation and characterization of heterotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **16**, 17-29.
- Kondo, K., Takade, A. and Amako, K. 1994. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. *FEMS Microbiology Letters* **15**, 179-184.
- Korhonen, L.K. and Martikainen, P.J. 1991. Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. *Journal of Applied Bacteriology* **71**, 379-382.
- Kramer, J.G. and Singleton, F.L. 1992. Variations in rRNA content of marine *Vibrio* sp. during starvation-survival and recovery. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 201-207.
- Krcme'ry, V.Jr, Bajizukova, A., Langsadl, L., Kotuliakova, M. and Sobotova, O. 1989. Evaluation of the resistance of Enterobacteriaceae strains to antibiotics - comparison of strains from clinical material versus environment. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology Immunology* **33**, 299-304.
- Kroer, N. 1994. Relationships between biovolume and carbon and nitrogen content of bacterioplankton. *FEMS Microbiology Ecology* **13**, 217-224.
- Lambert, M.A., Hickman-Brenser, F.W., Framer, J.J. and Wayne Moss, C. 1983. Differentiation of Vibrionaceae species by their cellular fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**, 777-792
- Lambert, T., Gerbaud, G. and Courvalin, P. 1988. Transferable amikacin resistance in *Acinetobacter* sp. due to a new type of 3'-aminoglycoside phosphotransferase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **32**, 15-19.
- Lambert, T., Gerbaud, G., Bouvet, P., Vieu, J.F. and Courvalin, P. 1990. Dissemination of amikacin resistance of aphA6 in *Acinetobacter* sp. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **34**, 1244-1248.
- Lamka, K.G., LeChevallier, M.W. and Seidler, R.J. 1980. Bacterial contamination of drinking water supplies in a modern rural neighbourhood. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 649-654.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R. 1991. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by novel sigma factor σ^S . *Journal of Bacteriology* **173**, 4474-4481.

- Langsrud, S. and Sundheim, G. 1996. Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 411-418.
- Lappin-Scott, H.M., Cusack, F., MacLeod, A. and Costerton, J.W. 1988. Starvation and nutrient of *Klebsiella pneumoniae* isolated from oil well waters. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 541-549.
- Larsen, T.E., Goodsell, D.S., Cascio, D., Grzeskowisk, K. and Dickerson, R.E. 1989. The structure of DAPI bound to DNA. *Journal of Biomolecular Structure Dynamic* **7**, 477-491.
- Lawrence, J.R. and Hendry, J.M. 1996. Transport of bacterial through geologic ordier. *Comm Journal Microbiology* **42**, 410-422
- Le François, M. and Baum, J.L. 1976. *Flavobacterium endophthalmitis* following keratoplasty. *Archives of Ophtalmology* **94**, 1907-1909.
- LeBaron, P. and Joux, F. 1994. Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4345-4350.
- Lebaron, P., Roux, V., Lett, M. C. and Baleux, B., 1993. Effects of pili rigidity and energy availability on conjugative plasmid transfer in aquatic environments. *Microbiology Release* **2**, 127-133.
- Lechevallier, M.W. and Mc Feters, G.A. 1990. Microbiology of activated carbon. In *Drinking Water Microbiology*, Edited by Mc Feters, G.A.,pp 104-119. Springer Verlag, New York.
- Lechevallier, M.W., and McFeters, G.A.1985. Enumerating injures coliforms in drinking water. *Journal American Water Works Association* **77**, 81-87.
- Lechevallier, M.W., Babdock, T.M. and Lee, R.G. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2714-2724.
- LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D. and Lee, R.G. 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 649-654.
- Lechevallier, M.W., Schulz, W. and Lee, R.G. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 857-862.

- Leclerc, H. 1976. Criteria for the evaluation of hygienic and microbiologic characteristics of mineral waters. *Annali del Instituto Superiori Sanita* **12**, 210-217.
- Leclerc, H. 1994a. Les eaux minérales naturelles: flore bactérienne native, nature et signification. *Eaux Minérale '94*, 49-60.
- Leclerc, H. 1994b. Les eaux minérales naturelles. Epidémiologie comparée et contrôle bactériologique. *Eaux minérales '94*, 61-74.
- Leclerc, H., Mossel, D.A.A. and Savage, C. 1985. Monitoring non-carbonated mineral waters for aerobic colonization. *International Journal of Food Microbiology* **2**, 341-347.
- Leclerc, H. and Da Costa, M.S. 1998. The microbiology of natural mineral water. In *Technology of Bottled Water*. Ed. Dorothy A.G. and Ashurst, P.R, **3**, pp 223-273, Sheffield Food Technology.
- Lee, K.-H. and Ruby, E.G. 1995. Symbiotic role of the viable but nonculturable state of *Vibrio fischeri* in Hawaiian coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 278-283.
- Letarte, Y. and Pinel-Alloul, B. 1991. Relationship between bacterioplankton production and limnological variables: necessity of bacterial size considerations. *Limnology-Oceanography* **36**, 1208-1216.
- Letarte, Y., Hansen, H.J., Sondergaard, M. and Pinel-Alloul, B. 1992. Production and abundance of different bacterial size-classes: relationships with primary production and chlorophyll concentration. *Archives Hydrobiology* **126**, 15-26.
- Lewis, R.N.A.H. and McElhaney, R.N. 1993. Studies of mixed-chain diacyl phosphatidylcholines with highly asymmetric acyl chains- a Fourier transform infrared spectroscopic study of interfacial hydration and hydrocarbon chain packing in the mixed interdigitated gel phase. *Biophysics Journal* **65**, 1866-1877.
- Liebert, C. and Barkay, T., 1988. A direct viable counting method for measuring tolerance of aquatic microbial communities to mercury. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 1090-1095.
- Linder, K. and Oliver, J.D. 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but non culturable state of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2837-2842.
- Lindqvist, R., Cho, J.S., and Enfiel, C.G. 1994. A kinetics model for diversity dependent bacterial

transport in porous media. *Water resource Research*

Lopez-Amoros, R. Mason, D.J. and Lloyd, D. 1995. Use of two oxonols and a fluorescent tetrazolium dye to monitor starvation of *Escherichia coli* in seawater by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* **22**, 165-176.

Lucas, F. and Ducluzeau, R. 1990. Antagonistic role of various bacterial strains from the autochthonous flora of gas-free mineral water against *Escherichia coli*. *Sciences des Aliments* **10**, 62-73.

Ludvigsen, L., Albrechtsen, H.-J., Holst, H. and Christensen, T.H. 1997. Correlating phospholipid fatty acids (PLFA) in a landfill leachate polluted aquifer with biogeochemical factors by multivariate statistical methods. *FEMS Microbiology Reviews* **20**, 447-460.

Luli, G.W., Talnagi, J.W., Strohl, W.R. and Pfister, R.M. 1983. Hexavalent chromium-resistant bacteria isolated from river sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 846-854.

Lundgren, B. 1981. Fluorescein diacetate as a stain for metabolically active bacteria. *Oikos* **36**, 17-22.

Lyttle, M.S., Adams, J.C., Dickman, D.G. and Bressler, W.R. 1989. Use of nutrient response techniques to assess the effectiveness of chlorination of rapid sand filter gravel. *Applied Environmental Microbiology* **55**, 29-32.

Madsen, E.L. and Bollag, J.M. 1989. Aerobic and anaerobic microbial activity in deep subsurface sediments from the Savannah river plant. *Geomicrobiology Journal* **7**, 93-101.

Magarinos, B., Ronnalde, J.L., Cid, A. and Toranzo, A.E. 1997. Viability of starved *Pasteurella piscida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation. *Letters in Applied Microbiology* **24**; 122-126.

Manaia, C.M., Nunes, O.C. and Morais, P.V. 1990. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 871-876.

Mancuso, C.A., Franzmann, P.D., Burton, H.R. and Nichols, P.D. 1990. Microbial community structure and biomass estimates of a methanogenic antarctic lake ecosystem as determined by phospholipids analyses. *Microbial Ecology* **19**, 73-95.

- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.-H and Stentrom, T.-A. 1993. *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 2293-2298.
- Manzini, G., Barcellona, M.L., Avitabile, M. and Quadrifoglio, F. 1983. Interaction of diamino-2-phenylindole (DNA) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Research* **11**, 8861-8876.
- Mare, I.J. 1968. Incidence of R factors among Gram negative bacteria in drug free human and animal communities. *Nature* **220**, 1046-1047.
- Marouga, R. and Kjelleberg, S. 1996. Synthesis of immediate upshift (Iup) proteins during recovery of marine *Vibrio sp.* strain S14 subjected to long-term carbon starvation. *Journal of Bacteriology* **178**, 817-822.
- Martinez, O.V., Gratzner, H.G., Malinin, T.I. and Ingram, M. 1982. The effect of some β -lactam antibiotic on *Escherichia coli* studied by flow cytometry. *Cytometry* **3**, 129-133.
- Martins, L.O., Jurado, A.S. and Madeira, V.M. 1990. Composition of polar lipid acyl chains of *Bacillus stearothermophilus* as affected by temperature and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta* **1045**, 17-20.
- Mason, C.A. and Egly, T. 1993. Dynamics of microbial growth in the decelerating and stationary phase of batch culture, p. 81-102. In S. Kjelleberg (ed.). Starvation in bacteria. Plenum Publishing Corporative., New York, N.Y.
- Mason, D.J., Lopez-Amoros, R., Alman, R., Stark, J.M and Lloyd, D. 1995. The ability of sub membrane potential dyes and calcafluore white to distinguish between viable and not viable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 309-315.
- Mason, M., Allman, R. and Lloyd, D. 1993. Uses of membrane potential sensitive dyes with bacteria. In *Flow Cytometry in Microbiology* ed. Lloyd, D. pp.67-82. London : Spring Verlag.
- Massa, S., Petruccioli, M., Fanelli, M. and Gori, L. 1995. Drug resistant bacteria in non carbonated mineral waters. *Microbiology Research* **150**, 403-408.
- Mathieu, L., Paquin, J.L., Block, J.C., Randon, G., Maillard, J. and Reasoner, D.J. 1992. Paramètres

gouvernant la prolifération bactérienne dans les réseaux de distribution. *Revue des Sciences de l'Eau* **5**, 91-112.

Matin, A. 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**, 3-10.

Matin, A., Auger, E.A., Blum, P.H. and Schultz, J.E. 1989. Genetic basis of starvation survival in non differentiating bacteria. *Annual Review of Microbiology* **43**, 293-316.

Matsuzawa, Y., and Yoshikawa, K. 1994. Change of the higher order structure in a giant DNA induced by 4', 6-diaminido-2-phenylindole as a minor groove binder and ethidium bromide as an intercalator Nucleosides Nucleotides. *Applied and Environmental Microbiology* **13**, 1415-1423.

Matzuyama, T. 1984. Staining of living bacteria with rhodamine 123. *FEMS Microbiology Letters* **21**, 153-157.

Mavridou, A. 1992. Study of the bacterial flora of a non-carbonated natural mineral water. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 355-361.

Mazzini, A., Cavatorta, P., Iori, M., Favilla, R. and Sartor, G. 1992. The binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole to bovine serum albumin. *Biophysics Chemistry* **46**, 217-226.

Mc Dougald, D., Rice, S.A., Weichart, D. and Kjelleberg, S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation ? *FEMS Microbiology Ecology* **25**, 1-9.

Mc Garrity, J.T. and Armstrong, J.B. 1981. The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology* **27**, 835-840.

McCann, M.P., Kidwell, J.P. and Matin, A. 1991. The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **13**, 4188-4194.

McCarthy, C.M. and Murray, L. 1996. Viability and metabolic features of bacteria indigenous to a contaminated deep aquifer. *Microbial Ecology* **32**, 305-321.

McDonell, M.T. and Hood, M.A. 1982. Isolation and characterization of ultramicrobacterium from Gulf cost estuary. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 566-571.

McFeters, G. A., Kippin, J.S., and Lechevallier, M.W. 1986. Injured coliforms in drinking water .

Applied and Environmental Microbiology **51**, 1-5.

McFeters, G. A., Singh, A., Buyne, S., Callis, P.R. and Williams, S. 1991. Acridine Orange staining reaction as an index of physiological activity in *Escherichia Coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **13**, 87-97.

McKay, A.M. 1992. The viable but non culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Letters in Applied Microbiology* **14**, 129-135.

Merino, J.R. 1976. Méthodes microbiologiques d'analyses des eaux minérales. *Annales Istituto Superiori Sanita* **12**, 142-169.

Meyer-Reil, L.A. 1978. Autoradiography and epifluorescence microscopy combined for the determination of number and spectrum of actively metabolizing bacteria in natural water. *Applied and Environmental Microbiology* **36**, 506-512.

Miettinen, I.T., Vartiainen, T. and Martikainen, P.J. 1997. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3242-3245.

Miller, L. and Berger. 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard, note d'application N°228-238.

Mishra, P. and Kaur, S. 1991. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Applied of Microbiology and Biotechnology* **34**, 697-702.

Misumi, H., Umeda, A., Eguchi, K., Okada, K., Sawae, Y., Niho, Y. and Amako, K. 1994. Characterisation of the external surfaces of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human blood and respiratory tract. *Journal of Medical Microbiology* **40**, 282-287.

Moffat, B.D. and Snell, T.W. 1995. Rapid toxicity assessment using an in vivo enzyme test for *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Ecotoxicological Environment Safety* **30**, 47-53.

Monfort, P. and Baleux, B. 1994. Effects of environmental factors present in the St Lawrence estuary (Quebec, Canada) on experimental survival of *Salmonella salamae* as determined by flow cytometry. *Canadian Journal of Microbiology* **40**, 712-719.

- Monteoliva-Sanchez, M. and Ramos-Cormenzana, A. 1986. Effect of growth temperature and salt concentration on the fatty acid composition of *Flavobacterium halmephilum* CCM 2831. *FEMS Microbiology Letters* **33**, 51-54.
- Monteoliva-Sanchez, M. and Ramos-Cormenzana, A. 1987. Cellular fatty acid composition in moderately halophilic Gram-negative rods. *Journal of Applied Bacteriology* **62**, 361-366.
- Monteoliva-Sanchez, M., Ferrer, M.R., Ramos-Cormenzana, A., Qesada, E. and Monteoliva, M. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*. Affect of growth temperature and salt concentration. *Journal of General Microbiology* **134**, 199-203.
- Moore, L.V.H., Bourne, D.M. and Moore, W.E.C. 1994. Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic Gram-negative bacilli. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 338-347.
- Morais, P.V. and Da Costa, M.S. 1990. Alterations in major heterotrophic bacterial populations isolated from a still bottled mineral water. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 750-757.
- Moreira, L., Agostinho, P., Morais, P.V. and Da Costa, M.S. 1994. Survival of allochthonous bacteria in still mineral water bottled in polyvinyl (PVC) and glass. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 334-339.
- Morgan, J.A.W., Cranwell, P.A. and Pickup, R.W. 1991. survival of *Aeromonas Salmonicida* in lake water. *Applied Environmental Microbiology* **57**, 1777-17882.
- Morinigo, M.A., Cornas, R., Castro, D., Jimenez-Notaro, M., Romero, P. and Borrego, J.J. 1990. Antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from natural polluted water. *Journal of Bacteriology* **68**, 297-302.
- Morita, N., Gotoh, M., Okajima, N., Okuyama, H., Hayashi, H., Higashi, S. and Murata, N. 1992. Both the anaerobic pathway and aerobic desaturation are involved in the synthesis of unsaturated fatty acids in *Vibrio* sp. strain ABE-1. *FEBS Letters* **297**, 9-12.
- Morita, R.Y. 1990. The starvation-state of micro-organisms in nature and its relationship to the bioavailable energy. *Reviews* 813-817.
- Morita, R.Y. 1990. The starvation-survival state of micro-organisms in nature and its relationship to bioavailable energy. *Experientia* **46**, 813-817.

- Morita, R.Y. 1993. Bioavailability of energy and the starvation state, in *Starvation in Bacteria* (ed. S. Kjelleberg), Plenum Press, New York and London, pp 1-23.
- Morrozi, G., Sportolari, R., Caldini, G., Cenci, G. and Morossi, A. 1988. The effect of anaerobic wastewater treatment on faecal coliforms and antibiotic resistant faecal coliforms. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene* **185**, 340-349.
- Moss, C.W., Hollis, D.G. and Weaver, R.E. 1988. Cultural and chemical characterization of CDC groups EO-2, M65, and M66, *Moraxella* species, *Oligella urethralis*, *Acinetobacter* species, and *Psychrobacter immobilis*. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 484-492.
- Mosso-Romeo, M.A., De La Rosa Jorge, M.C., Diaz, F., Alonzo, F. and De Iriarte, E. 1981. Microbiología del agua de Carabaña. *Annales de la Real Academia de Farmacia* **47**, 327-334.
- Mosso-Romeo, M.A., Diaz, F. and De La Rosa, M.C. 1985. Contribucion al estudio de los bacterias autochtonous de marrantiales de agua mineramedicinales de Carabana. *Annales Bromatologie* XXXVII-2, 271-278.
- Muela, A., Pocino, M., Arana, I., Justo, J.I., Iriberry, J. and Barcina, I. 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4273-4278.
- Mueller, R.F. 1994. Biofilm formation in water systems and their industrial relevance. *Biological Sciences Symposium* 195-201.
- Mueller, R.F. 1996. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Water Research* **30**, 2681-2690.
- Mueller, R.F., Characklis, W.G., Jones, W.L. and Sears, J.T. 1992. Characterization of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis. *Biotechnology Bioengineering* **39**, 1161-1170.
- Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S. and Kell, D.B. 1995. Secretion of an antimicrobial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67**, 289-295.
- Mukamolova, G.V., Yanopolskaya, N.D., Votyakova, T.V., Popov, V.I., Kaprelyants, A.S. and Kell, D.B. 1985. Biochemical changes accompanying the long-term starvation of *Micrococcus*

- luteus* cells in spent growth medium. *Archives of Microbiology* **163**, 373-379.
- Murray, G.E., Tobin, R.S. and Kushner, D.J. 1984. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 73-77.
- Nagata, T. 1986. Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 28-32.
- Nagata, T. and Watanabe, Y. 1990. Carbon- and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. *Applied Environmental Microbiology* **56**, 1303-1309.
- Nagy, A.E. and Csatory, K.N. 1974. Bacteriological and pharmacological investigations with garamycin R (gentamicin). *Acta Microbiology Academy Science hung* **21**, 289-291.
- Nelson, D.R., Sadlowski, Y., Eguchi, M. and Kjelleberg, S. 1997. The starvation-stress response of *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Microbiology* **143**, 2305-2312.
- Nichols, P.D. and White, D.C. 1989. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in a methane-enriched, halogenated hydrocarbon-degrading soil column: implications for microbial community structure and nutritional status. *Hydrobiologia* **176/177**, 369-377.
- Nichols, P.D., Henson, J.M., Antworth, C.P., Parsons, J., Wilson, J.T. and White, D.C. 1987. Detection of a microbial consortium, including type II methanotrophs, by use of phospholipid fatty acids in an aerobic halogenated hydrocarbon-degrading soil column enriched with natural gas. *Environment Toxicology and Chemistry* **6**, 89-97.
- Nichols, P.D., Smith, G.A., Antworth, C.P., Hanson, R.S. and White, D.C. 1985. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidising bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **31**, 327-335.
- Niemi, M., Sibakov, M. and Niemela, S. 1983. Antibiotics resistance among different species of faecal coliforms isolated from water samples. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 79-83.
- Nwoguh, C.E., Harwood, C.R. and Barer, M.R.. 1995. Detection of induced β -galactosidase activity in individual non-culturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay. *Molecular Microbiology* **17**, 545-554.

- Nyström, T. 1994. The glucose-starvation stimulant of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. *Molecular Microbiology* **12**, 833-843.
- Nyström, T., Olsson, R.M. and Kjelleberg, S. 1992. Survival, stress resistance, and alteration in protein expression in the marine *Vibrio* sp. Strain S14 during starvation for different individual nutrients. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 55-65.
- O'Morchoe, S.B., Ogunseitan, O., Sayler, G.S. and Miller, R.V. 1988. Conjugal transfer of R68.45 and FP5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in a freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 987-995.
- Obana, M. and Nakai, T. 1991. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Antimicrobiological Chemotherapy* **28**, 791-800.
- Ogan, M.T. 1992. Microbiological quality of bottled water sold in retail outlets in Nigeria. *Journal of applied bacteriology* **73**, 175-181.
- Oger, C., Hernandez, J.F., Delattre, J.M.; Delabroise, A.H., and Krupsky, S. 1987. Etude par épifluorescence de l'évolution de la microflore totale dans une eau minérale embouteillée. *Water Research*. **21**: 469-474.
- Okamoto, T., Taguchi, H., Nakamura, K., Ikenaga, H., Kuraishi, H. and Yamasato, K. 1993. *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Archives Microbiology* **160**, 333-337.
- Oku, H. and Kaneda, T. 1988. Biosynthesis of branched-chain fatty acids in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biology and Chemistry* **263**, 18386-18396.
- Okuyama, H., Okajima, N., Sasaki, S., Higashi, S. and Murata, N. 1991. The *cis/trans* isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes in ambient temperature in the psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochimica et Biophysica Acta* **1084**, 13-20.
- Oliver, J.D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells. In *Starvation in bacteria* ed. Kjelleberg, S. pp. 239-272. New York: Plenum Press.
- Oliver, J.D. 1995. The viable but non culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters* **133**, 203-208.

- Oliver, J.D. and Colwell, R.R. 1973. Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**, 442-458.
- Oliver, J.D., McDougald, D., Barrett, T., Glover, L.A. and Prosser, J.I. 1995. Effect of temperature and plasmid carriage on nonculturability in organisms targeted for release. *FEMS Microbiology Ecology* **17**, 229-238.
- Ordonnez, J.V. and Wehman, N.M., 1993. Rapid flow cytometric antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* **14**, 811-818.
- Osburne, M.S., Maiese, W.M. and Greenstein, M. 1989. Cinodine, a glycoinnamylspermidine antibiotic inhibits DNA gyrase. Abstracts of American Society of Microbiology Annual Meeting p.23. New Orleans La, 1989. Washington: American Society of Microbiology.
- Overbeek, L.S., van Elsas, J.D., Trevors, J.T. and Starodub, M.E. 1990. Long-term survival of and plasmid stability in *Pseudomonas* and *Klesiella* species and appearance of non-culturable cells in agricultural drainage water. *Microbiology Ecology* **19**, 239-249.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J. and Olsen, G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances Microbiology Ecology* **9**, 1-55.
- Page, S. and Burns, R.G.. 1991. Flow cytometry as a means of enumerating bacteria introduced into soil. *Soil Biology Biochemistry* **23**, 1025-1028.
- Palleroni, N.J. and Bradhury, J.F. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas malthophilia* (HUGH 1980) SWINGS *et al.* 1983. *International Systematic of Bacteriology* **43**, 606-609.
- Palmer, L.M., Baya, A.M., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. 1984. Molecular genetic and phenotypic alteration of *Escherichia coli* in natural water microcosms containing toxic chemicals. *FEMS Microbiology Letters* **21**, 169-173.
- Paludan-Müller, C., Weichart, D., McDougald, D. and Kjelleberg, S. 1996. Analysis of starvation conditions that allow for prolonged culturability of *Vibrio vulnificus* at low temperature. *Microbiology* **142**, 1675-1684.

- Palumbo, A.V., Zhang, C., Liu, S., Scarborough, S.P., Pfiffner, S.M. and Phelps, T.J. 1996. Influence of media on measurement of bacterial populations in the subsurface. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57/58**, 905-914.
- Papapetropoulou, M., Illiopoulos, J., Rodopoulou, G., Detorakis, J. and Oaniara, O. 1994. Occurrence and antibiotic-resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in southern Greece. *Journal of Chemotherapy* **6**, 111-116.
- Paquin, J.L., Sibille, I., Queroy, F. and Hartemann, P. 1994. Interférences des désinfectants sur le dénombrement des bactéries aquatiques par épifluorescence avec l'acridine orange et le DAPI, p 43. In *Abstract of the "le point sur la microbiologie de l'environnement"* meeting of French Society of Microbiology 1994. Institut Pasteur, Paris, FRANCE.
- Parker, J.H., Smith, G.A., Fredrickson, H.L., Vestal, J.R. and White, D.C. 1982. Sensitive assay, based on hydroxy-fatty acids from lipopolysaccharide lipid A for gram-negative in sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 1170-1177.
- Parkes, R.J. and Taylor, J. 1983. The relationship between fatty acid distributions and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine Coastal Shelf Science* **16**, 173-198.
- Parveen, S., Murphee, R.L., Edmiston, L. Kaspar, C.W., Portier, K.M. and Tamplin, M.L. 1997. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and non point sources of *Escherichia coli* in Apalachicola bay. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2607-2612.
- Paul, J.H. 1982. Use of Hoechst dyes 33258 and 33342 for enumeration of attached and planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 939-944.
- Paul, J.H. and Jeffrey, W.H. 1985. Evidence for separate adhesion mechanisms of hydrophilic and hydrophobic surfaces in *Vibrio pasteolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 431-437.
- Pedersen, J.C. and Jacobsen, C.S. 1993. Fate of *Enterobacter cloacae* JP120 and *Alcaligenes eutrophus* AEO16 (pRO101) in soil during water stress: effects on culturability and viability. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1560-1564.
- Pedersen, M.M., Marco, E. and Pickett, M.J. 1970. Nonfermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *American Journal of Clinical Pathology* **54**, 178-192.

- Peele, E.R. and Colwell, R.R. 1981. Application of direct microscopic method for enumeration of substrate, responsive marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **27**, 1071-1075.
- Peterson, T.C., and Ward, R.C. 1989. Development of a bacterial transport model for coarse soils. *Water Resource Bulletin* **25**,349-357.
- Philippon, A., Labia, R. and Jacoby, G. 1989. Extended spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **33**, 1131-1136.
- Pinter, M. and Kantor, M. 1973. Quantitative antibiotic sensitivity pattern *Acinetobacter* strains. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal Microbiology Serology* **37**, 197-200.
- Piper, P.W. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiology Letters* **134**, 121-127.
- Pomerol, C. and Ricour, J. 1992. Terroirs et Thermalisme de France. Eds BRGM.
- Pommepeuy, M., Butin, M., Derrien, A, Gourmelon, M., Colwell, R.R. and Cormier, M. 1996. Retention of enteropathogenicity by viable but non culturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4621-4626.
- Pond, D.W., Bell, M.V., Dixon, D.R., Fallick, A.E., Segonzac, M. and Sargent, J.R. 1998. Stable-carbon-isotope composition of fatty acids in hydrothermal vent mussels containing methanotrophic and thiotrophic bacterial endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 370-375.
- Poremba, K. 1995. Hydrolytic enzymatic activity in deep sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **16**, 213-222.
- Porter, J., Diaper, J., Edwards, C. and Pickup, R. 1995. Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2783-2786.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology Oceanography* **25**, 943-948.

- Pringle, J.H. and Fletcher, M. 1983. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surface. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 811-817.
- Püttman, M., Ade, N. and Hof, H. 1993. Dependence of fatty acid composition of *Listeria* sp. on growth temperature. *Research of Microbiology* **144**, 279-283.
- Pyle, B.H., Broddway, S.C. and McFeters, G.A. 1995. Factors affecting the determination of respiratory activity on the basis of cyanoditolyl tetrazolium chloride reduction with membrane filtration. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4304-4309.
- Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenza, A. and Gonzalez-Lopez, J. 1986. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjaron area (Spain). *Journal of Applied Bacteriology* **61**, 365-372.
- Quinn, J.P. 1984. The modification and evaluation of some cytochemical techniques for the enumeration of metabolically active heterotrophic bacteria in the aquatic environment. *Journal of Applied Bacteriology* **57**, 51-57.
- Rachline, M. 1996. L'eau minérale naturelle. Collection Encyclopédique 3000. Eds ATLAS.
- Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M.A.R. and Colwell, R.R. 1996. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 112-120.
- Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P.A., Russek-Cohen, E. and Colwell, R.R. 1994. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3573-3578.
- Rahmati-Bahram, A., Magee, J.T. and Jackson, S.K. 1995. Growth temperature-dependent variation of cell envelope lipids and antibiotic susceptibility in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **36**, 317-326.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Imamura, N. and Urushigawa, Y. 1992. Variations in microbial biomass and community structure in sediments of eutrophic bays as determined by phospholipid ester-linked fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 562-571.
- Ramos-Cormenzana, A., Nietto-Sanchez, M.C. and Olivares-Pascual, J. 1980. Estudio microbiológico de aguas de Lanjaron. *Annales de la Real Academia de Farmacia* **2**, 59-65.

- Ramsay, A.J., and Bawden, A.D. 1983. Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange. *Soil Biology Biochemistry* **15**, 263-268.
- Ravel, J., Knight, I.T., Monahan, C.E., Hill, R.T. and Colwell, R.R. 1995. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation?. *Microbiology* **141**, 377-383.
- Raynel, L., Barnwell, P. and Gervais, P. 1994. The use of epifluorescence to determine the viability of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to osmotic shifts. *Journal of Bacteriology* **36**, 121-127.
- Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 1-7.
- Reeve, C.A., Amy, P.S. and Matin, A. 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **160**, 1041-1046.
- Richards, J., Stokely, D. and Hipgrave, P. 1992. Quality of drinking water. *British Medical Journal* 304-571.
- Riveira, F., Glavan, M. and Robles, E. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *Journal of Protozoology* **28** 54-56.
- Rivilla, R. and Gonzalez, C. 1988. Simplified methods for the microbiological evaluation of bottled natural mineral waters. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 273-278.
- Robertson, B.R., and Button, D.K., 1989. Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* **10**, 70-76.
- Rodriguez, GG, Philipps, D, Ishigmo, K. and Ridgway, H.F. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied Environmental and Microbiology* **58**, 1801-1808.
- Rollins, D.M. and Colwell, R.R. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 531-538.
- Rosemberg, F.A. 1990. The bacterial flora of natural mineral waters and potential problem

associated with its ingestion. *Rivista Italiana d'Igiene* **50**, 303-310.

Rosemberg, F.A. and Duquino, H.H. 1989. Antibiotic resistance of *Pseudomonas* from German mineral waters. *Toxicity Assessment* **4**, 281-294.

Roslev, P. and King, G.M. 1993. Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 2891-2896.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R. 1987a. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2889-2983.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R. 1987b. Survival strategies of bacteria in natural environment. *Microbiology Reviews* **51**, 365-379.

Roszak, D.B., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. 1984. Viable but non recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian Journal of Microbiology* **30**, 334-338.

Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T. and Millard, P.J. 1997. Bacterial viability and susceptibility testing with sytox green nucleic acid stain. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2421-2431.

Rottem, S., Markowitz, O. and Razin, S. 1978. Thermal regulation of the fatty acid composition of lipopolysaccharides and phospholipids of *Proteus mirabilis*. *European Journal of Biochemistry* **85**, 445-450.

Rusin, P.A., Rose, J.B., Haas, C.N. and Gerba, C.P. 1997. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Review Environmental Contaminant Toxicology* **152**, 57-83.

Russell, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. and Abee, T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 255-261.

Sabry, S.A., Ghozlan, H.A. and Abou-Zeid, D.-M. 1997. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of bacterial population isolated from sea water. *Journal of Applied Microbiology* **82**, 245-252.

Saint Onge, A., Romeyer, F., Lebel, P., Masson, L. and Brousseau, R. 1992. Specificity of the *Pseudomonas* PAO 1 lipoprotein I gene as a DNA probe and PCR target region within the

Pseudomonadaceae. *Journal of General Microbiology* **138**, 733-741.

Sajbidor, J. 1997. Effect of some environment factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Critical Reviews in Biotechnology* **17**, 87-103.

Sajbidor, J. and Grego, J. 1992. Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiology Letters* **83**, 13-16.

Salyers and Amalabde-Cuevas. 1997. Why are antibiotic resistances gives so resistant to elimination? *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **41**, 2321-2325.

Santo Domingo, J.W., Kaufman, M.G., Klug, M.J. and Tiedje, J.M. 1998. Characterization of the cricket microbial and fluorescently labeled RNA Targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 752-755.

Saye, D.J., Ogunseitan, O., Sayler, G.S. and R.V., Miller. 1987. Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 987-995.

Schaule, G., Flemming, H. C. and Ridgway, H.F. 1993. Use of 5-Cyano- 2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3850-3857.

Schleper, C. Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U, Klenk, H.P. and Zillig, W. 1995. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archae capable of growth around <pH 0. *Journal of Bacteriology* **177**, 7050-7059.

Schmidt-Lorenz, W. 1976. Microbiological characteristics of natural mineral water. *Annali de l'Istituto Superiore di Sanita*. **12**, 93-112.

Schmidt-Lorenz, W. and Jaeggi N. 1983. Colony counts at 42° C for the evaluation of hygienic quality of bottled natural uncarbonated mineral water. *Microbiology Aliments Nutrition* **1**, 377-391.

Schmidt-Lorenz, W., Bischofberger, T., and Cha, S.-K. 1990. A simple nutrient-tolerance (NT) test for the characterization of the different types of oligocarbotolerant and oligocarbofile water

- bacteria from non-carbonated mineral water. *International Journal of Food Microbiology* **10**, 157-176.
- Schmidt-Lorenz, W., Bischofberger, T., Cha, S.K. and Schmitt, R. 1987. The bacterial flora and the value of elevate temperature (42° C) count in detecting pollution in bottled natural non-carbonated mineral waters. *13th International Symposium of the International Union of Microbiological Societies*, Halkidiki/Greece.
- Schnürer, J. and Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 1256-1261.
- Scholefield, J., Manson, R., and Jonston, R.J. 1976. The direct staining of micro-organisms by selected fluorochromes. *Procedure Rapid Method Autom. Microbiology* **2**, 253-260.
- Scholl, M.A., Mills, A.L., Herman, J.S., and Hornberger, G.M. 1990. The influence of mineralogy and solutions chemistry on the attachment of bacteria to representative aquifer materials. *Journal Contaminants Hydrology* **6**, 321-336.
- Scholz, O. and Boon, P.I. 1993. Biofilms on submerged River Red Gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Myrtaceae) wood in billabongs: an analysis of bacterial assemblages using phospholipid profiles. *Hydrobiologia* **259**, 169-178.
- Schupp, D.G. and Erlandsen, S.-L. 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 3850-3857.
- Schut, F., Gottschal, J.C. and Prins, R.A. 1997. Isolation and characterization of the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *FEMS Microbiology Reviews* **20**, 363-369.
- Schwaller, P. and Schmidt-Lorenz, W. 1981. La flore microbienne de quatre eaux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles. 2^{ème} communication: Les *Pseudomonas* et autres bactéries à Gram négatif. Composition fine de la flore. *Zentralblatt fur Bakteriologie und Hygiene I Abt. Orig. C2*, 179-196.
- Schwaller, P. and Schmidt-Lorenz, W. (1980) Flore microbienne de quatre eaux minérales non gazéifiées et mises en bouteilles, I. Dénombrement de colonies; Composition grossière de la flore,

et caractères du groupe des bactéries Gram négatives pigmentées en jaune. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene. I. Abt. Orig.* C1, 330-347.

Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettick, D., Falsen, E., Kersters, K. and De Vos, P. 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* LEIFSON and HUGH 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *International Systematic of Bacteriology* **44**,499-501.

Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K. and De Vos, P. 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas* gen. nov. As *Brevundimonas* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 499-510.

Servis, N.A., Lytle, M.S., Midchum, D.B., Leake, R.A. and Adams, J.C. 1993. Comparison of isopropyl cinodine with nalidixic acid in the direct viable count. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 583-587.

Shahamat, M., Mai, U., Paszko-Kolva, C., Kessel, M. and Colwell, R.R. 1993. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1231-1235.

Sharma, P.K., and MC Inerney, M.J. 1994. Effects of grain size on bacterial penetration, reproduction, and metabolic activity in porous glass bead chambers. *Applied Environmental Microbiology* **60**, 1481-1486.

Shaw, D.R. and Cabelli, V.J. 1980. R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and faecal strains. *Applied and Environmental Microbiology* **40**, 756-764.

Shiga, Y., Mizuno, H. and Akanuma, H. 1993. Conditional synthesis and utilization of 1,5-anhydroglucitol in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **175**, 7138-7141.

Siegele, D.A. and Kolter, R. 1992. Life after log. *Journal of Bacteriology* **174**, 345-348.

Sinclair, J.L., and Ghiorse, W.C. 1989. Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae, and fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiology Journal* **7**, 15-31.

- Sinensky, M. 1971. Temperature control of phospholipid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **106**, 449-455.
- Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation – A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. National Academy Science USA* **71**, 522-525.
- Singh, A., Pyle, B.H. and Mc Feters, G.A. 1989. Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. *Journal of Microbiological Methods* **10**, 91-101.
- Sizemore, R.K. and Colwell, R.R. 1977. Plasmids carried by antibiotic resistant marine bacteria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **12**, 373-382.
- Sjogren, R.E. and Gibson, M.J. 1981. Bacterial survival in a dilute environment. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 1331-1336.
- Skowroned, P., Krummech, G., Hoferkamp, O. and Rodd, G. 1990. Flow cytometry as a tool to discriminate respiratory competent and respiratory deficient yeast cells. *Currents Genetics* 265-267.
- Smith, D.H. 1967. R factor infection of *Escherichia coli* lyophilized in 1946. *Journal of Bacteriology* **94**, 2071-2072.
- Smith, D.L., Gumery, L.B., Smith, E.G., Stableforth, D.E., Kaufmann, M.E. and T.L., Pitt. 1993. Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis units: evidence of person-to-person transmission. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 3017-3022.
- Smith, G.A., Davis, J.D., Muscat, A.M., Moe, R.L. and White, D.C. 1989. Lipid composition and metabolic activities in benthic near-shore microbial communities of Arthur harbor, Antarctic peninsula: comparisons with McMurdo sound. *Polar Biology* **9**, 517-524.
- Smith, G.A., Nichols, P.D. and White, D.C. 1986. Fatty acid composition and microbial activity of benthic marine sediment from McMurdo sound, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* **38**, 219-231.
- Smith, J.J. and McFeters, G.A. 1996. Effects of substrates on INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl) -5-phenyl tetrazolium chloride reduction with membrane filtration. *Applied Environmental Microbiology* **61**, 4304-4309.
- Smith, J.J. and McFeters, G.A. 1997. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3(4-nitrophenyl)-5-

- phenyl tetrazolium chloride) and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K12. *Journal of Microbiological Methods* **29**, 161-175.
- Smith, J.J., Huwington, J.P. and McFeters, G.A. 1994. Survival, physiological response, and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2977-2984.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W.H. Freeman.
- Soderstrom, B.E., 1979. Some problems in assessing the fluorescein diacetate-active fungal biomass in the soil. *Soil Biology Biochemistry* **11**, 147-148.
- Sokary, T.G., Ibiele, D.D. and Ottih, R.M. 1988. Antibiotic resistance among coliforms and *Pseudomonas* sp. from bodies and water around Port Harcourt, Nigeria. *Journal of Applied Bacteriology* **64**, 355-359.
- Sorensen, S.J. 1991. Survival of *Escherichia coli* K12 in seawater. *FEMS Microbiology Ecology* **85**, 161-168.
- Soussy, C.J. 1997. Communiqué 1997. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Concentrations critiques et diamètres critiques correspondants pour les bactéries à croissance rapide. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **12**, 369-377.
- Spector, M.P., Park, Y.K., Tirgari, S., Gonzalez, T. and Foster, J.W. 1988. Identification and characterization of starvation-regulated genetic loci in *Salmonella typhimurium* by using Mu d-directed *lacZ* operon fusions. *Journal of Bacteriology* **170**, 345-351.
- Spino, D.F. 1985. Characterization of dysgonic, heterotrophic bacteria from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1213-1218.
- Srinivasan, S., Ostling, J., Rocky de Nys, T.C., Takayama, K. and Kjelleberg, S. 1998. Extracellular signal molecule(s) involved in the carbon starvation response of marine *Vibrio* sp. strain S14. *Journal of Bacteriology* **180**, 201-209.
- Stackenbrandt, E. 1997. Identifying culturable and uncultured prokaryotes. *Symbiosis* **22**, 47-58.

- Stead, D.E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* sp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 281-295.
- Steen, H.B., Boye, E., Skarstad, K., Bloom, B., Godal, T. and Mustafa, S. 1982. Applications of two cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects and quantitation of antibody binding. *Cytometry* **2**, 249-257.
- Steinert, M. Emody, L., Amann, R. and Hacker, J. 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila philadelphia* JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2047-2053.
- Stevens, T.O. 1995. Optimization of media for enumeration and isolation of aerobic heterotrophic bacteria from the deep terrestrial subsurface. *Journal of Microbiological Methods* **21**, 293-303.
- Sundh, I., Nilsson, M. and Borga, P. 1997. Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1476-1482.
- Suutari, M. and Laakso, S. 1992. Temperature adaptation in *Lactobacillus fermentum*: interconversions of oleic, vaccenic and dihydrosterulic acids. *Journal of General Microbiology* **138**, 445-450.
- Suzuki, M.T., Sherr, E.B. and Sherr, B.F. 1993. DAPI direct counting underestimates bacterial abundances and average cell size compared to AO direct counting. *Limnology Oceanography* **38**, 1566-1570.
- Szabo, A.C., Krajcarski, D.T., Cavatorta, P., Masotti, L. and Barcelona, M.L. 1986. Excited state pKa behaviour of DAPI. A rationalisation of the fluorescence enhancement of DAPI in DAPI-nucleic acid complexes. *Photochemistry-Photobiology* **44**, 143-150.
- Tabor, P.S., Ohwada, K. and Colwell, R.R. 1981. Filterable marine bacteria found in the deep sea: distribution, taxonomy and response to starvation. *Microbial Ecology* **7**, 67-83.
- Tamaoka, J., Ha, D.M. and Komagata, K. 1987: Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov. with an emended description of the genus *Comamonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 52-59.

Tampo, D. 1992. Les eaux conditionnées. Collection Sciences et Techniques Agro-Alimentaires. Eds TEC/DOC Lavoisier.

Tan, T.L. 1997. Biolog metabolic fingerprints for clustering marine oligotrophic bacteria from polar regions, p. 161-170. In H. Insam and A. Rangger (Eds.) Microbial communities. Functional Versus structural approaches. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Tan, Y., Gannon, J.T., Bavaye, P., and Alexander, M. 1994. Transport of bacteria in a aquifer sand: experiments and model simulations. *Water Resource Research* **30**, 3243-3252.

Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratemeyer, L.S. and Wilson, W.D. 1992. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* **31**, 3103-3112.

Tebbut Thy and Paraskevopoulos, A.G.. 1981. Viability parameters for activated sludge. *Environmental Technology Letters* **2**, 293-302.

Thom, S.M., Horobin, R.W., Seidler, E. and Barer, M.R. 1993. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 433-443.

Thomas, J. A., Buchsbaum, R.N., Zimniak, A. and Racker, E. 1979. Intra-cellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated *in situ*. *Biochemistry* **18**, 2210-2218.

Thomas, T.D. and Batt, R.D. 1969. Synthesis of protein and ribonucleic acid by starved *Streptococcus lactis* in relation to survival. *Journal of General Microbiology* **58**, 363-369.

Thorsen, B.K., Enger, O., Norland, S. and Hoff, K.A. 1992. Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1624-1628.

Thuillier, P. 1990. Les mythes de l'eau. *La recherche* **21**, 537-547.

Tobin, R.S. 1984. Water treatment for home and cottage. *Canadian journal of Public Health* **75**, 79-82.

- Torella, F. and Morita, R.Y. 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 518-527.
- Toshi Kameda. 1991. Iso and Anteiso- fatty acid in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews* **55**, 288-302.
- Tronova, 1984. Microflora of different types of mineral waters of south-east region of west Siberia. *Microbiologia* **43**, 129-132.
- Trousselier, M., Bouvy, M., Courties, C. and Dupuy, C. 1997. Variation of carbon content among bacterial species under starvation condition. *Aquatic Microbiology Ecology* **13**, 113-119.
- Trousselier, M., Courties, C. and Vaquer, A. 1993. Recent application of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biology of the Cell* **78**, 111-121.
- Troxler, J., M., Zala, Y., Moenne-Loccoz, Keel, C. and Defago, G. 1997. Predominance of nonculturable cells of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the surface horizon of large outdoor lysimeters. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3776-3782.
- Tsai, G.-J. and Yu, S.-C. 1997. Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 137-143.
- Tsuji, T., Kawasaki, Y., Takeshima, S., Sekiya, T. and Tamara, S. 1995. A new fluorescence staining assay for visualizing living micro-organisms in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3415-3421.
- Tunlid, A. and White, D.C. 1990. Use of lipid biomarkers in environmental samples, p. 259-274. In A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, and G. Odham (ed.), *Analytical microbiology methods*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Tunlid, A., Baird, B.H., Trexler, M.B., Olsson, S., Findlay, R.H., Odham, G. and White, D.C. 1985. Determination of phospholipid ester-linked fatty acids and poly b-hydroxybutyrate for the estimation of bacterial biomass and activity in the rhizosphere of the rape plant *Brassica napus* (L.). *Canadian Journal of Microbiology* **31**, 1113-1119.

- Tunlid, A., Hoitink, H.A.J., Low, C. and White, D.C. 1989. Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1368-1374.
- Turpin, P.E., Maycroft, K.A., Rowlands, C.L. and Wellington, E.M.H. 1993. Viable but non-culturable *Salmonella* in soil. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 421-427.
- Ullrich, S., Karrasch, A., Hoppe, H.-G., Jeskulke, K. and Mehrens, M. 1996. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4587-4593.
- Vachée, A., Mossel, D.A. and Leclerc, H. 1997. Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 652-658.
- Vachee, A., Vincent, P., Struijk, C.B., Mossel, D.A.A. and Lecxlerc, H. (1997) A study of the fate of the autochthonous bacterial flora of still mineral waters by analysis of restriction fragment length polymorphism of genes coding for rRNA. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 492-503.
- Van haeke, E., Remon, J.P., Moors, M., Raes, F., De Ruder, D. and Van Petighem, A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: Role of cell surface hydrophobicity. *Applied Environmental Microbiology* **56**, 788-795.
- Van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A.J. 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 1898-1901.
- Van Overbeek, L.S., Ebert, L., Givskov, M., Molin, S. and Van Elsas, J.D. 1995. Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 4202-4208.
- Van Veen, J.A., Van Overbeek, L.S. and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of micro-organisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 121-135.
- Vancanneyt, M. Witt, S., Abraham, W.-R, Kersters, K. and Fredrickson, H.L. 1996. Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of *Pseudomonads* : a taxonomic evaluation. *Systematic and Applied Microbiology* **59**, 528-540.

- Vauterin, L., Yang, P., Hoste, B., Pot, B., Swings, J. and Kersters, K. 1992. Taxonomy of *Xanthomonads* from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. *Journal of General Microbiology* **138**, 1467-1477.
- Vess, R.W., Anderson, R.L., Carr, J.H., Bond, W.W. and Favero, M.S. 1993. The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 215-221.
- Vestal, J.R. and White, D.C. 1989. Lipid analysis in microbial ecology. *Bioscience* **39**, 535-541.
- Veys, A., Callewaert, W., Waelkens, E. and Van den Abbelee, K. 1989. Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting gram-negative bacteria in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 1538-1542.
- Vila, J., Marcos, A., Marco, F., Abdalla, S., Vergara, Y., Reig, R., Gomez-Lus, R. and Jimenez de Anta, T. 1993. *In vitro* antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **37**, 138-141.
- Virta, M., Lineri, S., Kankaanpaa, P., Karp, M., Peltonen, K., Nuutila, J. and Lilius, E. 1998. Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 515-519.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. and Scheifler, K.H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria : inadequacy of culture-dependent methods for describing community structure. *Applied Environmental Microbiology* **59**, 1520-1525.
- Wai, S.N., Moriya, T., Kondo, K., Misum, H. and Amako, K. 1996. Resuscitation of *Vibrio cholerae* 01 strain TSI-4 from a viable but non culturable state by heat shock. *FEMS Microbiology Letters* **136**, 187-191.
- Walsh, S., Lappin-Scott, H.M., Stockdale, H. and Herbert, B.N. 1995. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes. *Journal of Microbiological Methods* **24**, 1-9.

- Wang, A.Y. and Cronan, J.E. 1994. The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS (KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Molecular Microbiology* **11**, 1009-1017.
- Wanner, U. and Egli, T. 1990. Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiology Review* **6**, 19-43.
- Warburton, D.W., Dodds, K.L., Burke, R., Johnston, M.A. and 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.
- Warburton, D.W., Peterkin, P.I., Weiss, K.F. and Johnston, M.A. 1986. Microbiological quality of bottled water sold in Canada. *Canadian Journal of Microbiology* **32**, 891-893.
- Washington, J.A. 1969. Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae and nonfermenting Gram-negative bacilli. *Mayo. Clinical Process* **44**, 811-824.
- Wauters, G., Boel, A., Voorn, G.P., Verhaegen, J., Meunier, F., Janssens, M. and Verbist, L. 1995. Evaluation of a new identification system, Crystal enteric/ non-fermenter, for Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 845-849.
- Weber, F.J., Isken, S. and De Bont, J.A. 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**, 2013-2017.
- Webster, J.G., Hampton, J., Wilson, J.T. Ghiorse, W.C. and Leach, F.R. 1985. Determination of microbial cell numbers in subsurface samples. *Ground Water* **22**, 17-25.
- Weddle, C.L. and Jenkins, D. 1971. The viability and activity of activated sludge. *Water Research* **5**, 621-640.
- Weichart, D., McDougald, D., Jacobs, D. and Kjelleberg, S. 1997. *In situ* analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2754-2758.
- Welch, D.F. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, 422-438.

Wess, R.W., Anderson, R.L., Carr, J.H., Bond, W.W. and Favero, M.S. 1993. The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 215-221.

White, D.C. and Ringelberg, D.B. 1997. Utility of signature lipid biomarker analysis in determining the in situ viable biomass, community structure, and nutritional / physiologic status of deep subsurface microbiota, Amy, P.S., Haldeman, D.L. (eds.), *The microbiology of the terrestrial deep subsurface*, pp. 119-136.

White, D.C., Stair, J.O., Ringelberg, D.B. 1996. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 185-196.

Wilkinson and Kers. 1998. Bottled water as a source of multi-resistance *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *European Journal of Cancer Care* **7**, 12-14.

Willems, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Jantzen, E., Hoste, B., Gillis, M., Kersters, K., Auling, G. and De Ley, J. 1989. *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and *Pseudomonas carboxy flava*), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 319-333.

Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Frantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J. 1990. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov. and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**, 384-398.

Williams, M.N., Qumby, H. and Romberg, E. 1994. Evaluation and use of a low nutrient medium and reduced incubation temperature to study bacterial contamination in the water supply of dental units. *Canadian Journal of Microbiology* **40**, 127-131.

Wilson, J.T., Mc Nabb, J.F., Balkwill, D.L. and Ghiorse, W.C. 1983. Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. *Ground water* **21**, 134-142.

Winding, A., Binnerup, S.J. and Sorensen, S.J. 1994. Viability of indigenous soil bacteria by

- respiratory activity and growth. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2869-2875.
- Witzal, K.P., Moaledj, K. and Overbeck, H.J. 1982. A numerical taxonomic comparison of oligocarbophilic and saprophytic bacteria isolated from lake Plubsee. *Archives fur Hydrobiologie* 507-520.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbial Review* **51**, 221-271.
- Wünsche, L. and Babel, W. 1996. The suitability of the Biolog automated Microbial Identification System for assessing the taxonomical composition of terrestrial bacterial communities. *Microbiology Research* **151**, 133-143.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. 1982. Survival and viability of non-cultural *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *FEMS Microbiology Ecology* **8**, 313-323.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arkawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology Immunology* **36**, 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Oyaizu, Yano, I., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Yamamoto, H. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov. *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov. *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov. *Sphingomonas capsulata* comb. nov. and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiology Immunology* **34**, 99-119.
- Yamaguchi, N., Nasu, M., Choi, S.T., and Kondo, M. 1994. Analysis of the life cycle of *Bacillus megaterium* by fluorescein diacetate/propidium iodide double staining method. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* **22**, 65-68.
- Yamamoto, H., Hashimoto, Y. and Ezaki, T. 1996. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiology Ecology* **20**, 149-154.
- Yano, Y., Nakayama, A., Ishihara, K. and Saito, H. 1998. Adaptative changes in membrane lipids of barophilic bacteria in response to changes in growth pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 479-485.

- Yoshikawa, S., Mitsui, N., Chikara, K., Hashimoto, H., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 1995. Effect of salt stress on plasma membrane permeability and lipid saturation in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 131-135.
- Young, H.K. 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**, 627-635.
- Yu, F.P., Pyle, B.H. and McFeters, G.A. 1993. A direct viable count method for enumerating of attached bacteria and assessment of biofilm disinfection. *Journal of Microbiological Methods* **17**, 167-180.
- Yu, W., Dodds, W.K., Banks, M.K., Skalsky, J. and Strauss, E.A. 1995. Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with 2 fluorescent dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3367-3372.
- Yura, T., Nagai, H. and Mori, H. 1993. Regulation of heat-shock response in bacteria. *Annual Review Microbiology* **47**, 321-350.
- Yurdusev, N. and Ducluzeau, R. 1985. Evolution qualitative et quantitative de la flore microbienne d'une eau minérale plate embouteillée dans des bouteilles de verre ou de plastique. *Science des Aliments* **5**, 231-238.
- Zelibor, J.L., Doughten, M.W., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. 1987. Testing for bacterial resistance to arsenic in monitoring well water by the direct viable counting method. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2929-2934.
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T. and Beese, F. 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soils Biology and Biochemistry* **24**, 317-323.
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Ma, R.X., Rackwitz, R., Winter, K. and Beese, F. 1994. Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and polyhydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biology and Biochemistry* **26**, 439-446.
- Zheng, M. and Kellogg, S.T. 1994. Analysis of bacterial populations in a basalt aquifer. *Canadian Journal of Microbiology* **40**, 944-954.
- Zimmermann, R. and Meyer-Reil, L.A. 1975. A new method for fluorescence staining of bacterial

populations on membranes filters. *Kieler Meeresforsch* **30**, 24-27.

Zimmermann, R., Iturriaga, R. and Becker-Birck, J. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number there of involved in respiration. *Applied and Environmental Microbiology* **36**, 926-935.

Zobell, C.E. and Anderson, Q. 1936. Observation on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biology Bulletin* **71**, 324-342.

Zweifel, U.L. and Hagstrom, A. 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2180-2185.

