

Dissertationsnummer: 7044

La flore bactérienne dans les eaux minérales
naturelles non gazéifiées et mises en bouteilles :
dénombrements de colonies, différenciation taxonomique de
la flore, paramètres physiologiques de la croissance

T H E S E

présentée à

l'Ecole polytechnique fédérale de Zürich
pour l'obtention du titre de

Docteur ès sciences techniques

par

PIERRE SCHWALLER

dipl. en technologie
alimentaire EPF-Z

né le 8 janvier 1950
originaire de Luterbach (SO)

acceptée sur proposition

du Professeur Dr. W. SCHMIDT-LORENZ, rapporteur
du Professeur Dr. M. BACHMANN, corrapporteur

ABSTRACT

The current knowledge of colony counts, distribution of bacterial genera present in several bottled waters from natural sources and their specific properties is still incomplete. In particular, the bacteriological consequences due to the change from a dynamic to a static system, for example for drinking water, are to date little known. Natural non-carbonated and bottled water is an ideal model to illustrate this phenomena, because this water is bottled in large quantities and in well standardized and reproducible qualitative conditions.

CHAPTER I : In preliminary experiments, the influence of some analytical parameters such as composition of the diluent solution, shaking of the bottle, culture media, culture methods and incubation period were determined. Four french bottled mineral waters (A, B, C and D) were quantitatively and qualitatively investigated microbiologically, i.e. 3 bottles of each charge 1 and 3 weeks after the bottling operation. The maximum number of colony-forming units was determined using the surface colony count method and an incubation period of 21 days at 20°C, not with the pour plate method officially prescribed in other countries. Plate Count Agar diluted 10 fold and "Collins-Agar" produced higher colony counts than did undiluted Plate Count Agar. The highest colony counts were observed one week after bottling, ranging from 36,000 to 260,000 CFU per ml, 3 weeks after bottling these figures were 60 to 75 % lower, ranging from 18,000 to 85,000 colonies per ml.

CHAPTER II : Representative colonies (1200) were isolated at random on each of three different culture media for the rough identification of the bacterial flora and its distribution in the four waters. Five different groups could be distinguished : the *Pseudomonas* (20 to 50% of the flora); the group of Gram negative, yellow pigmented rods (6 to 44%); the group "*Acinetobacter-Alcaligenes-Moraxella*" (15 to 45%); Gram positive and Gram variable cocci; and a group of bacteria, unculturable upon the first isolation (both 5 to 10%).

A more detailed identification of the group of Gram negative, yellow pigmented bacteria (248 strains) and the group of the *Pseudomonas* (467 strains) was made using more than 30 biochemical and physiological tests. The very heterogenous group of the yellow pigmented rods could be subdivided into four groups according to two main characteristics, the oxidase reaction and motility. The strains of *Pseudomonas* could be subdivided

into four groups according to their four main characteristics, the production of a fluorescent pigment, the presence of an arginine dehydro-lase, oxidative metabolism of glucose and alcalinisation of the medium. Only the first group was easily identifiable. The three other groups were very heterogenous and did not show properties typical of *Pseudo-monas* species. The distribution of the isolated bacterial flora in the four mineral waters showed that each water has its own distinguishing "finger print", although each group of bacteria is present in all 4 mineral waters to a different extent. In all the waters, the majority of strains were slow or very slow growing; this being a typical physiological property for the isolated bacteria of mineral water.

CHAPTER III : The optimal, maximal and minimal growth temperatures of 17 representative strains were determined with a "Temperature-Gradient-Incubator". The optimal temperatures varied from 20 to 32°C with generation times in the range between 1,2 to 6,5 hours. Only a few strains could grow at 37 or 39°C, and no strain could grow at 42°C. Minimal temperatures could not be assessed after 7 days. All the strains could grow at 0°C after a prolonged incubatory period during several weeks. A linear correlation was found between the bacterial cellular mass and the concentration of nutrients of the liquid medium. With two representative strains, the highest growth rates were observed in a diluted liquid medium (0,85 g of organic matter per liter). A bacterial proliferation was possible even in distilled water when the initial number of cells was low enough. The strains tested possessed marked adaptative abilities and were typically oligocarbotoleant.

Under certain conditions (very low nutrient concentration of medium, mixed flora directly isolated from original water cultures), the artificial increase of the surface-volume ratio with glass beads could provoke a decrease of the generation time of these bacteria.

RÉSUMÉ

Les connaissances actuelles concernant le nombre de germes et la composition des genres bactériens présents dans les eaux de sources naturelles mises en bouteilles ainsi que leurs propriétés spécifiques sont encore insuffisantes. En particulier, les conséquences bactériologiques inhérentes au passage de l'eau d'un système dynamique à un système statique en vase clos, par exemple d'une eau de consommation, sont encore peu connues. L'eau minérale naturelle, non gazéifiée et mise en bouteille représente un modèle idéal pour illustrer ce phénomène, car elle est soutirée en grandes quantités et dans des conditions qualitatives standardisées et bien reproductibles.

CHAPITRE I : Après avoir déterminé dans des essais préliminaires l'influence de quelques paramètres analytiques tels que la solution de dilution, l'agitation de la bouteille, les milieux et méthodes de culture et la durée incubatoire, quatre eaux minérales naturelles et non gazéifiées françaises (sources A, B, C et D) ont subi des analyses microbiologiques quantitatives et qualitatives à raison de 3 bouteilles par livraison et de 3 livraisons, 1 puis 3 semaines après leur date de soutirage. Les nombres maximaux de colonies formant plages ont été obtenus avec la méthode d'ensemencement en surface et une incubation de 21 jours à 20°C, et non avec la méthode d'ensemencement en profondeur prescrite officiellement dans divers pays. Plate Count Agar dilué 10 fois et "Collins-Agar" ont produit des nombres de colonies plus élevés que Plate Count Agar non dilué. Les nombres de colonies les plus élevés ont été observés 1 semaine après le soutirage, ceux-ci variant entre 36.000 et 260.000 par ml, alors qu'ils accusaient une diminution de 60 à 75% 3 semaines après le soutirage, se situant alors entre 18.000 et 85.000 colonies par ml.

CHAPITRE II : 1200 colonies représentatives ont été isolées statistiquement à partir de 3 milieux de culture pour effectuer en premier lieu une différenciation grossière de la flore bactérienne et de sa distribution dans les quatre eaux. Cinq groupes distincts ont pu être formés : les *Pseudomonas* (20 à 50 % de la flore), le groupe des bactéries Gram négatif et pigmentées en jaune (6 à 44 %), le groupe "*Acinetobacter-Alcaligenes-Moraxella*" (15 à 45 %), les coques à Gram positif et Gram variable et un groupe de bactéries n'ayant pu être recultivées après l'isolement primaire (5 à 10 % pour les deux groupes).

Une différenciation fine du groupe des bactéries Gram négatif et pigmentées en jaune (248 souches) et du groupe des *Pseudomonas* (467 souches) a été ensuite entreprise en utilisant plus de 30 tests biochimiques et physiologiques. Le groupe très hétérogène des bactéries pigmentées en jaune a pu être divisé en quatre groupes sur la base de deux caractères généraux, la réaction oxidase et la mobilité. Les souches de *Pseudomonas* ont pu être réparties en quatre groupes sur la base de leurs quatre caractéristiques principales, la production d'un pigment fluorescent, la présence d'une dihydrolase de l'arginine, le métabolisme oxidatif du glucose et l'alcalinisation du milieu. Seul le premier groupe était facilement identifiable. Les trois autres groupes ont été très hétérogènes et ne possédaient pas les propriétés habituellement typiques de *Pseudomonas species*. La distribution dans les quatre eaux minérales de la flore bactérienne isolée montrait que chaque eau se distinguait par sa propre "empreinte digitale", bien que chaque groupe de bactéries ait été présent dans les quatre eaux, mais dans des proportions variables. Dans toutes les eaux, la majorité des souches était à croissance lente à très lente, propriété physiologique typique à ces bactéries isolées d'eaux minérales.

CHAPITRE III : Les températures optimales, maximales et minimales de la croissance de 17 souches représentatives ont été déterminées à l'aide d'un incubateur à gradient de températures. Les températures optimales se situaient entre 20°C et 32°C avec des temps de génération allant de 1,2 à 6,5 heures. Seule une partie des souches avait la faculté de croître à 37 ou 39°C, mais aucune souche n'a pu proliférer à 42°C. Les températures minimales n'étaient pas définitivement atteintes après 7 jours ; toutes les souches ont pu en effet croître à 0°C après une période incubatoire prolongée à plusieurs semaines.

Une corrélation linéaire a été établie entre la masse cellulaire bactérienne et la concentration en matières nutritives dans le milieu nutritif liquide. Avec deux souches représentatives, les temps de génération les plus rapides étaient observés dans un milieu nutritif liquide dilué (0,85 g de matières organiques par litre). Une prolifération bactérienne était possible même dans de l'eau distillée si l'ensemencement initial était assez faible. Les souches testées possédaient de grandes facultés d'adaptation et étaient typiquement oligocarbotolérantes.

Sous certaines conditions (très faibles concentrations en matières nutritives, flore "mixte" isolée directement d'eau minérale sans passage intermédiaire sur un milieu de laboratoire), l'augmentation du rapport surface-volume créé par l'adjonction de billes de verre dans la bouteille pouvait provoquer une diminution du temps de génération de ces bactéries.