

La signification du nombre et de la nature des microorganismes telluriques présents dans l'eau minérale à l'émergence

R. DUCLUZEAU (*)

Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France.

Les nombreuses analyses microbiologiques effectuées depuis le début de ce siècle par les hygiénistes, ont mis en évidence la présence constante de populations bactériennes dans l'eau des sources les mieux protégées. On a donc été amené à considérer qu'une eau minérale possède toujours sa propre flore composée de microorganismes habituellement qualifiés de banaux. Les études menées depuis le début du siècle au sujet de la microbiologie des eaux minérales ont été tout naturellement orientées, comme dans le cas des autres produits alimentaires, vers la recherche des bactéries pathogènes ou la mise en évidence de bactéries qui pourraient être des indices d'une pollution fécale de la source. Par contre nos connaissances concernant la nature et l'évolution dans l'eau minérale de ces populations microbiennes dites banales sont restées très pauvres. Cependant la détection de ces bactéries banales en nombre relativement élevé dans les eaux plates, en particulier lorsqu'elles sont embouteillées en flacons de résine plastique, a posé récemment la question de leur signification hygiénique pour le consommateur.

NATURE DE LA MICROFLORE « BANALE » DE L'EAU MINÉRALE

Comme l'ont souligné de nombreux auteurs la flore banale de l'eau minérale est presque exclusivement constituée de bacilles Gram négatifs non sporulés. Si l'on s'en tient à la classification américaine du Bergey's manual, ces bactéries appartiennent soit à la famille des *Pseudomonadaceae* et aux genres *Pseudomonas* ou *Xanthomonas*, soit à l'ex-famille des *Achromobacteriaceae* et aux genres *Flavobacterium*, *Achromobacter* ou *Acinetobacter*. D'après notre propre expérience ce sont les genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Achromobacter* qui sont les plus fréquemment rencontrés.

(*) Maître de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire d'Ecologie Microbienne - C.N.R.Z. - 78350 - Jouy-en-Josas, France.

Il faut tout de suite noter que la taxonomie de ces groupes bactériens, longtemps ignorés de la bactériologie médicale car considérés comme non pathogènes, reste encore très imprécise et souvent peu concordante d'un auteur à l'autre.

La distinction en espèces qui s'avère encore plus délicate que la distinction en genres, est souvent basée sur des critères sans grande signification. C'est le cas par exemple du genre *Pseudomonas* où, à part l'espèce *P. aeruginosa* bien individualisée car pathogène, la distinction en espèces se base, entre autres caractères, sur la présence d'une enzyme protéolytique capable d'hydrolyser la gélatine. Or des travaux de notre laboratoire ont montré que ce caractère était très instable: les souches-filles issues d'une colonie gélatinase-positives possèdent ou non ce caractère, et inversement les souches-filles issues d'une colonie gélatinase-négative peuvent ou non posséder ce caractère. Des travaux supplémentaires restent donc nécessaires pour que l'on puisse affecter à chacune des souches bactériennes banales de l'eau minérale une position taxonomique sûre. Deux caractères physiologiques semblent toutefois être exigés pour que de telles bactéries puissent s'établir dans l'eau minérale au sens écologique de ce terme, c'est-à-dire s'y multiplier et y persister en nombre constant:

1) être psychrophiles, c'est-à-dire capables de se multiplier à températures relativement basses, même si ces températures ne sont pas optimales pour leur croissance: la température moyenne des sources froides que nous considérons seules ici est en effet située autour de 12-15 °C;

2) être autotrophes strictes, c'est-à-dire capables de tirer à la fois leur énergie et leurs matériaux plastiques de sources exclusivement minérales, même si la croissance de ces bactéries est par ailleurs meilleure en présence d'une source de matière organique.

On doit noter que ces caractéristiques sont aussi celles des bactéries « banales » d'une eau de surface, au moins dans nos pays, de sorte qu'il n'est guère pensable de trouver dans ces eaux de surface une espèce bactérienne suffisamment spécifique pour servir d'indice de contamination d'une nappe souterraine par des eaux de surface.

PHYSIOLOGIE DE LA CROISSANCE DES BACTERIES « BANALES »

Des études ont été entreprises dans notre laboratoire pour mieux comprendre les caractéristiques de la croissance de ces bactéries. Ces études ont été poursuivies essentiellement avec une souche de *Pseudomonas sp.* apigmentée et une souche d'*Acinetobacter sp.*, dont nous avons étudié la croissance dans une eau minérale plate stérilisée au moment du prélèvement au griffon par passage sur filtre millipore. Nous résumerons ci-dessous les principaux résultats acquis.

Le nombre maximum de bactéries est obtenu à 22 °C en 24 à 36 h selon la souche utilisée. Ce nombre maximum se situe en moyenne à 5×10^5 bactéries par ml et ne dépasse jamais 9×10^5 . Ce nombre ne dépend pas en général de la taille de l'inoculum initial. On peut se demander quels sont les principaux facteurs qui limitent la croissance bactérienne à ce niveau.

L'aération souvent invoquée à propos de ces souches aérobies strictes ne semble guère en cause car nous n'avons pas observé de différence entre des cultures en tube vissé ou en fioles agitées: il est probable que la quantité d'oxygène dissoute dans l'eau suffit largement à cette croissance bactérienne réduite.

L'épuisement en aliments du milieu est un autre facteur plausible. Il n'est probablement pas le seul en cause: en effet si l'on distille 3 fois une eau minérale dans un appareil de quartz, on constate que l'on obtient une meilleure croissance des souches étudiées dans cette eau tridistillée que dans l'eau minérale initiale (3 à 5 fois plus de bactéries), bien que les substrats minéraux, censés servir d'aliment aux bactéries, soient alors absents. On doit donc en conclure que les faibles quantités de produits minéraux résiduels de l'eau distillée, ou les gaz dissous, tels que le CO_2 , l' NH_3 , l'azote sont suffisants à assurer la croissance bactérienne observée, ce qui n'a rien d'in vraisemblable si l'on pense que la population de 10^6 bactéries par ml finalement obtenue représente un poids de matière organique inférieur à un μg . En définitive, il semble donc que ce soit en fait la nature des sels minéraux présents dans l'eau, l'équilibre subtil existant entre eux, et finalement les conditions physico-chimiques qui en résultent qui soient pour une bonne part responsables de la limitation de la croissance de ces microorganismes.

Enfin, nous avons également constaté que la croissance maximale de ces bactéries pouvait être notablement augmentée par la présence de très faibles quantités de matière organique. La nature de cette matière organique semble de peu d'importance pour des bactéries armées, comme cela est bien connu pour les *Pseudomonas*, d'une variété d'enzymes leur permettant d'attaquer presque n'importe quel substrat. Par contre l'économie d'énergie qu'elles réalisent en remplaçant leur métabolisme autotrophe par un métabolisme hétérotrophe semble responsable de leur spectaculaire augmentation de croissance. Plusieurs conséquences importantes découlent de cette observation.

1) Dans toutes les études de laboratoire sur la croissance de ces souches dans l'eau minérale, il faut se garder soigneusement d'apporter des traces de milieu de culture organique avec l'inoculum bactérien utilisé: celui-ci doit être lavé au moins 3 fois et dilué au moins 1000 fois avec l'eau minérale étudiée. De nombreux résultats de la littérature sont critiquables à cet égard.

2) Une augmentation brutale du nombre des bactéries « banales » dans une nappe souterraine traduit, probablement souvent un apport de matière

organique par des eaux superficielles et pourrait donc constituer un indice de pollution par ces eaux.

3) Une des hypothèses pouvant expliquer la croissance souvent plus importante de ces bactéries dans des bouteilles de résine plastique pourrait être la migration de certaines substances organiques de la bouteille vers l'eau. Nos expériences ont montré que le problème était sans doute moins simple qu'il n'y paraît. Par exemple, pour certains lots de bouteilles, on observe un effet favorisant de la croissance bactérienne dans l'eau qui a rincé une bouteille. Mais si l'on attend quelques jours avant l'ensemencement, cet effet disparaît, ou même un effet inhibiteur peut apparaître. Pour d'autres lots de bouteille aucun effet n'apparaît.

SIGNIFICATION HYGIENIQUE DE LA FLORE « BANALE » DE L'EAU MINÉRALE

Ces bactéries présentes dans l'eau minérale à l'émergence ou dans l'eau embouteillée sont-elles capables d'entraîner, en produisant des métabolites toxiques, des désordres pathologiques dans l'organisme du consommateur?

Dans l'hypothèse où il y aurait production de métabolites toxiques par les germes autotrophes de l'eau, ce phénomène pourrait avoir lieu à deux moments différents: au cours de la multiplication des bactéries dans l'eau embouteillée, donc avant l'ingestion, ou à la suite d'une multiplication des bactéries ingérées, dans le tube digestif du consommateur.

De très nombreuses expérimentations chez l'animal et une longue période d'observation chez l'homme n'ont jamais confirmé la première hypothèse, c'est-à-dire la production de substances toxiques avant l'ingestion. Par contre, on ne connaît pratiquement rien des possibilités de multiplication des bactéries de l'eau minérale dans le tractus digestif de l'homme ou des animaux. La démonstration expérimentale de ce phénomène se heurte d'ailleurs à d'insurmontables difficultés chez l'animal « holoxénique » (conventionnel) hébergeant déjà une microflore très complexe et très abondante. En effet, il est maintenant démontré que la microflore habituellement présente dans le tube digestif exerce un très puissant effet antagoniste à l'égard de la plupart des bactéries provenant de l'environnement. Cependant, cet effet de barrière peut parfois disparaître temporairement pour des raisons encore inconnues et permettre alors la multiplication d'une souche bactérienne capable de jouer un rôle nocif. Chez l'animal axénique, dépourvu de toute microflore, cet effet de barrière n'existe pas, et toute souche bactérienne potentiellement capable de se multiplier dans le tractus digestif atteindra en 12 à 24 h un niveau moyen compris entre 10^9 et 10^{10} cellules viables par gramme de fécès fraîches et se maintiendra ensuite à ce niveau. Les animaux axéniques constituent donc un outil de choix pour savoir si les bactéries de l'eau

minérale sont capables de se multiplier et de se maintenir en nombre élevé dans le tube digestif et si, dans ce cas, elles peuvent y exercer des effets nocifs pour l'animal hôte.

Nous avons pu démontrer qu'aucune des espèces bactériennes « banales » isolées dans l'eau minérale n'était capable de s'établir, c'est-à-dire de se multiplier et de persister en nombre élevé dans le tube digestif de souris axéniques.

Pour certaines souches l'inoculum est détruit durant le transit dans le tube digestif, pour d'autres il survit, au moins en partie, à ce transit. Enfin, même si l'on fait transiter dans le tube digestif des animaux un inoculum contenant 5×10^9 bactéries, on ne voit pas apparaître de cellules mutantes ayant acquis les propriétés nécessaires pour s'établir dans le tube digestif des animaux. Une telle variation reste donc un événement hautement improbable. Il semble tout à fait vraisemblable que ce sont les conditions de potentiel d'oxydo-réduction et de température régnant dans le tube digestif qui empêchent la croissance des bactéries de l'eau minérale dans le tube digestif et non pas l'absence dans ce milieu d'un facteur de croissance. En effet, *in vitro* ces bactéries sont capables d'utiliser des milieux de culture très simples, comme l'eau minérale elle-même, mais ne croissent qu'au-dessous de 30 °C et en aérobiose stricte. Les conditions de potentiel d'oxydo-réduction et de température régnant dans le tube digestif des différents mammifères, et en particulier de l'homme, ne sont pas plus favorables à la croissance des bactéries de l'eau minérale que celles qui règnent chez la souris et on peut donc penser que l'absence d'établissement des bactéries de l'eau minérale observée chez la souris, peut s'extrapoler aux autres mammifères. On peut donc penser que l'établissement de ces bactéries chez l'homme est impossible, même lorsque l'équilibre de la flore est particulièrement fragile comme chez le nouveau-né, ou particulièrement perturbé comme chez le patient sous antibiothérapie orale.

Par ailleurs, des animaux gnotoxéniques hébergeant une population constante de bactéries banales de l'eau minérale en cours de transit n'ont jamais présenté de troubles pathologiques décelables à l'observation macroscopique. En particulier, nous n'avons jamais observé de diarrhées. Il en a été de même lorsque l'on a injecté intrapéritonalement des cultures de ces mêmes bactéries. Si l'on s'en réfère à ces critères, ces bactéries semblent donc dépourvues de pouvoir pathogène pour la souris gnotoxénique.

CONCLUSION

Il semble maintenant bien établi que les bactéries banales présentes au griffon des sources minérales ou dans l'eau embouteillée sont dépourvues de pouvoir pathogène à la fois parce qu'elles ne produisent pas de métabolites

toxiques et parce qu'elles sont incapables de se développer dans le tube digestif du consommateur. La présence de telles bactéries dans une bouteille n'a donc pas de signification défavorable du point de vue hygiénique.

Comme dans tout écosystème bactérien le niveau de croissance des bactéries banales d'une nappe d'eau souterraine semble étroitement réglé par les conditions physico-chimiques du milieu où elles vivent. D'une nappe souterraine à une autre, ces conditions peuvent différer, ce qui entraîne la présence de populations bactériennes différentes en quantité et en qualité. Par contre dans une nappe donnée, les conditions physico-chimiques du milieu sont habituellement très constantes au cours du temps et par conséquent la population bactérienne reste elle aussi très constante.

C'est pourquoi toute altération brutale de l'équilibre bactérien doit attirer l'attention de l'hygiéniste qui cherchera alors à déterminer l'origine de ce changement dans l'écosystème.

Dans l'eau embouteillée, le niveau de la population bactérienne banale reste sans signification hygiénique puisqu'il peut varier dans des proportions considérables en fonction des conditions de stockage, de la nature du flacon, et de la durée du stockage avant le prélèvement. Donc, pour l'eau prélevée à l'émergence comme pour l'eau embouteillée, les contrôles microbiologiques classiques bien mis au point par les hygiénistes et basés sur la recherche de microorganismes pathogènes, ou indices de contaminations fécales, restent de la plus haute importance et devront être effectués régulièrement avec toute la rigueur et le soin nécessaires.

Quant à la signification de la flore banale, inéluctablement présente dans une eau minérale qui ne subit aucun traitement d'assainissement comme l'exige la loi, nous nous rangerons à l'opinion déjà exprimée par divers auteurs: sa présence constitue la preuve qu'aucun traitement de désinfection n'a été appliqué à l'eau, et c'est précisément cette absence de traitement qui, à côté de leurs potentialités thérapeutiques, constitue un des intérêts majeurs des eaux minérales.

Résumé. — L'eau des sources minérales les mieux protégées contient toujours un faible nombre (souvent moins de 10/ml) de bactéries « autochtones », se multipliant et persistant indéfiniment dans la nappe. Ces bactéries sont psychrotrophes, capables de se multiplier en l'absence de traces dosables de matière organique, mais croissent bien mieux en présence de matière organique.

Elles sont très sensibles aux agents antiseptiques utilisés habituellement pour assainir les eaux de consommation. Ces bactéries se multiplient rapidement dans l'eau embouteillée pour des raisons qui restent encore inconnues. Cette multiplication n'entraîne cependant jamais l'apparition de

populations assez nombreuses pour troubler la limpidité de l'eau. On a démontré que ces bactéries autochtones étaient incapables de s'établir, c'est-à-dire de se multiplier et de persister en nombre élevé dans le tube digestif de souris axéniques buvant de l'eau minérale. On en a déduit qu'il n'existait aucun risque de multiplication dans l'organisme du consommateur. Le nombre absolu de ces bactéries dans l'eau embouteillée est donc sans signification hygiénique pour le consommateur et il ne paraît pas justifié d'établir une norme à cet égard. Dans la nappe, seule une élévation brusque du nombre de bactéries autochtones au-dessus du niveau habituel, lui-même très variable selon les nappes, est un indice défavorable.

En effet il peut alors correspondre à une infiltration accidentelle de matière organique et donc de bactéries pathogènes dans la nappe. La recherche des bactéries indices de pollutions fécales reste donc la méthode la plus sûre d'apprécier la qualité hygiénique d'une eau minérale comme des autres produits alimentaires.

Summary (Mineral water bacteria and their sanitary significance).

— Water of the best protected mineral sources always contains a small number (often less than 10/ml) of « autochthonous » bacteria which multiply and subsist infinitely in the underground sheets.

These bacteria are psychrotrophic, able to multiply in the absence of detectable traces of organic matter, but grow better in the presence of organic matter. They are very sensitive to the antiseptic agents currently used to purify drinking water. For reasons that are still unknown, these bacteria rapidly multiply in bottled water. However, this multiplication never leads to appearance of a sufficiently great number of populations to affect the limpidity of the water. It has been demonstrated that these autochthonous bacteria are not able to become established, *i. e.* to multiply and subsist in a great number in the digestive tract of axenic mice receiving mineral water. The conclusion of this is that there are no risks for multiplication of this bacteria in the organism of the consumer. The absolute number of these bacteria in bottled water has therefore no sanitary significance for the consumer and it seems not to be justified to establish standard recommendations with respect to this. In the water sheet, only an abrupt rise in the number of autochthonous bacteria beyond the usual level, which varies much according to sheets, represents an unfavourable indication. Indeed, this might correspond to an accidental infiltration of organic matter and consequently of pathogenic bacteria into the water sheet. Search for bacteria as indicators of fecal pollutions therefore remains the most reliable method for estimating the hygienic quality of mineral water or of any other food products.