

# Dérive des caractères phénotypiques de salmonelles provenant de porteurs sains dans l'eau de mer

*Phenetic alteration of salmonellas isolated from healthy carriers in seawater*

Amina Bakhrouf \*, Sami Zaafrane\*, Ridha Mzoughi, Kather Maatoug\*\*, Michel J. Gauthier\*\*\*

\*Faculté de pharmacie, rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisie

\*\*Centre national d'aquaculture, route de Khnis, 5000 Monastir, Tunisie

\*\*\*INSERM, Unité 452, 1, UFR de Médecine, avenue de Valombrose, 06107 Nice, France

**Mots clés :** *Salmonella*, eau de mer, survie, formes filtrables, identification.

**Key-words:** *Salmonella*, seawater, survival, filterable forms, identification.

## RÉSUMÉ

Bakhrouf Amina, S. Zaafrane, R. Mzoughi, K. Maatoug, M.J. Gauthier, 1994 - Dérive des caractères phénotypiques de salmonelles provenant de porteurs sains dans l'eau de mer. Mar. Life, 4 (2) : 3-8.

Il est maintenant bien établi que les entérobactéries subissent dans l'eau de mer des modifications qui aboutissent à des formes difficiles à retrouver par les techniques classiques de recherche et d'identification. Nous avons incubé quinze sérotypes de salmonelles mineures isolés de porteurs sains dans des microcosmes d'eau de mer et nous avons suivi les modifications de leurs principaux caractères phénotypiques durant une année. La plupart des sérotypes ont perdu les caractères-clé utilisés pour l'identification traditionnelle au genre *Salmonella*. Ils ont développé des activités  $\beta$ -galactosidase et uréase et sont devenus capables de produire de l'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer positive). Dans de rares cas, des souches réduisant le nitrate jusqu'en azote ont été isolées des microcosmes. L'apparition de microcellules capables de filtrer à travers des membranes à pores de  $0,45\mu\text{m}$  a également été observée pour toutes les souches étudiées. L'incidence de ces biais d'identification aux plans sanitaire et épidémiologique est évoquée.

## ABSTRACT

Bakhrouf Amina, S. Zaafrane, R. Mzoughi, K. Maatoug, M.J. Gauthier, 1994 - [Phenetic modification of salmonellas isolated from healthy carriers in seawater]. Mar. Life, 4 (2) : 3-8.

In seawater, enteric bacteria evolve towards a stressed state difficult to identify due to major alterations of their phenotype. Fifteen *Salmonella* serotypes isolated from healthy carriers were incubated in seawater and their main phenotypical traits were monitored over one year. Most of these bacteria lost characteristics usually used to identify salmonellas. Cells became progressively smaller and filterable on filters of  $0.45\mu\text{m}$  porosity. They used glucose via the butanediol way (Voges-Proskauer reaction positive) and exhibited in most cases  $\beta$ -galactosidase and urease activities. Some strains reducing nitrate to nitrogen were also isolated from seawater microcosms. The epidemiological and medical implications of these identification bias are outlined.

## INTRODUCTION

Il est maintenant connu et bien documenté que les bactéries entériques, pathogènes ou non, subissent dans l'eau de mer des modifications structurales et métaboliques très importantes (Chai, 1983 ; Kjelleberg *et al.*, 1987 ; Munro *et al.*, 1987 ; Gauthier *et al.*, 1989). Ces changements phénoty-

piques accompagnent leur évolution vers un état dormant, viable mais non cultivable au laboratoire, mis en évidence dans des microcosmes incubés à l'obscurité (Xu *et al.*, 1982 ; Roszak *et al.*, 1984 ; Colwell *et al.*, 1985 ; Roszak et Colwell, 1987 ; Colwell, 1987 ; Mc Kay, 1992) ou à la lumière (Barcina *et al.*, 1989). D'autres travaux ont par contre démontré que certains mécanismes de résistance

aux stress, et en particulier au choc hyperosmotique, peuvent conférer à ces germes une forte résistance aux conditions marines (Munro *et al.*, 1989). Quelles que soient la nature et les causes de cette évolution, il semble que la dérive phénotypique des espèces pathogènes comme les *Salmonella* puisse être un écueil à leur recherche et à leur identification par les techniques classiques utilisées lors du contrôle sanitaire des eaux et produits d'origine marine. Ceci a été antérieurement démontré dans le cas de *S. paratyphi* B (Bakhrouf *et al.*, 1992).

Le but de ce travail a été de vérifier le degré de variabilité phénotypique au sein du genre *Salmonella* pendant une période d'incubation dans l'eau de mer d'environ un an. Il a porté sur quinze sérotypes de *Salmonella* différents, isolés chez des porteurs sains, dont les caractères culturels et biochimiques ont été suivis périodiquement à l'aide de galeries d'identification rapide et de tests traditionnels.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Souches bactériennes et milieux de culture

Quinze sérotypes de *Salmonella* mineures (non *S. typhi*, non *S. paratyphi*), isolés chez des porteurs sains dans le Service d'Hygiène de la ville de Sousse (Tunisie), ont été utilisés au cours de cette étude : *S. wien* (S1), *S. agona* (S2), *S. livingstone* (S3), *S. bovismorbificans* (S4), *S. infantis* (S5), *S. agona* (S6), *S. braenderup* (S7), *S. virginia* (S8), *S. corvallis* (S9), *S. lindenburg* (S10), *S. anatum* (S11), *S. cerro* (S12), *S. enteritidis* (S13), *S. mbandaka* (S14), *S. zanzibar* (S15).

Ces bactéries ont été maintenues et cultivées à 37°C en bouillon Trypticase Soja (TSB, Bio-Mérieux, Marcy l'Étoile, France) ou sur gélose nutritive (GN, Institut Pasteur, Paris), sur GN additionné de 23 g de NaCl/l (GNNaCl) et sur GN préparée à l'eau de mer (GNEM).

### Tests de survie

Les cellules de chaque souche ont été cultivées en TSB pendant 6 heures à 37°C, puis lavées trois fois par centrifugation dans de l'eau usée filtrée sur papier filtre et autoclavée. Cette eau usée est d'origine domestique, elle ne passe pas par la station d'épuration mais ne contient pas d'effluents industriels ou agricoles particuliers. Après filtration, le dernier culot a été mis en suspension dans de l'eau de mer naturelle provenant d'une zone côtière non polluée de Monastir, filtrée sur membranes à pores de 0,2 µm (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Cette suspension a été inoculée dans des flacons contenant 600 ml de cette même eau de mer filtrée jusqu'à l'obtention d'une concentration de 10<sup>4</sup> à 10<sup>6</sup> unités formant colonies (ufc/ml). Les flacons ont été incubés à la température du laboratoire (25°C environ) et à la pénombre.

### Caractérisation phénotypique

Les modifications des caractères phénotypiques de ces souches dans les microcosmes d'eau de mer ont été suivies pendant environ un an.

L'apparition de cellules naines filtrables a été étudiée par filtration sur membranes à pores de 0,22 µm (Millipore) des filtrats de l'eau des microcosmes sur membranes à pores de 0,45 µm, en triple exemplaire pour chaque souche. Les filtres à pores de 0,22 µm ont ensuite été déposés sur GN, GNNaCl ou GNEM et l'apparition de colonies notée après 48 h d'incubation à 37°C.

Les caractères biochimiques, déterminés sur des clones isolés des microcosmes sur GNEM, ont été analysés immédiatement après l'isolement, à la fois sur galeries Api 20 E (Api-Systems, Bio-Mérieux) et dans les milieux traditionnels commercialisés par l'Institut Pasteur.

L'antibiorésistance des souches initiales et des clones isolés des microcosmes d'eau de mer a été déterminée pour les douze antibiotiques suivants : acide nalidixique, association triméthoprim-sulfaméthoxazole, céphalotine, céphotaxine, chloramphénicol, érythromycine, gentamycine, kanamycine, pénicilline, pristamycine, tétracycline et tobramycine. Les antibiogrammes ont été réalisés selon la méthode de Chabbert (1963) en milieu solide (Mueller-Hinton).

## RÉSULTATS

### Modifications morphologiques

Tous les sérotypes étudiés ont donné des cellules filtrables (CF) traversant les membranes à pores de 0,45 µm au cours de la quatrième semaine d'incubation en eau de mer. Dans le cas de *S. wien*, analysé de manière plus quantitative, le taux de CF est resté faible par rapport au nombre total des bactéries (Tableau I). Ces CF ont montré un meilleur potentiel de culture sur GNEM.

### Modifications culturelles

Avant leur inoculation en eau de mer, toutes les souches donnaient sur milieux GN et GNNaCl des colonies typiques des salmonelles : lisses, légèrement transparentes, non pigmentées et à contour régulier. Sur GNEM, les colonies étaient petites, opaques, bombées et à culture lente (72 h à 37°C). Après 20 jours d'incubation en eau de mer, l'aspect des colonies n'a pas changé sur GN et GNNaCl. Sur GNEM, par contre, on notait une dissociation en trois types de colonies : petites opaques, grandes opaques et petites transparentes. Après sept mois puis un an d'incubation, l'aspect des colonies développées sur GN et GNNaCl, opaques, à bord irrégulier et surelevé, était comparable à celui observé antérieurement pour *Salmonella paratyphi* B placée dans les mêmes conditions (Bakhrouf *et al.*, 1992). Sur GNEM, les trois types de colonies observées dès

Tableau I - Variation du nombre de cellules cultivables et de cellules filtrables de *Salmonella wien* (souche S1) dans l'eau de mer en fonction de la durée d'incubation et du milieu utilisé pour le dénombrement./Variations in the number of culturable cells and filterable cells of *S. wien* (strain S1) in seawater as a function of the duration of exposure to seawater and the medium used for enumeration.

Durée d'incubation dans l'eau de mer (jours)	Milieu de dénombrement <sup>a</sup>					
	GN		GNNaCl		GNEM	
	<sup>b</sup> UFC	<sup>b</sup> CF	UFC	CF	UFC	CF
1	10 <sup>6</sup>	0	2 x 10 <sup>6</sup>	0	1,5 x 10 <sup>6</sup>	0
20	2 x 10 <sup>5</sup>	10	10 <sup>5</sup>	10	4 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>
22	1,5 x 10 <sup>5</sup>	10	4,5 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>
24	2 x 10 <sup>5</sup>	1,7 x 10 <sup>2</sup>	2 X 10 <sup>4</sup>	15	1,4 x 10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
210	10 <sup>3</sup>	2	10 <sup>3</sup>	7	1,7 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> GN, gélose nutritive préparée à l'eau distillée ; GNNaCl, GN additionnée de NaCl (23 g/l) ; GNEM, GN préparée à l'eau de mer.

<sup>b</sup> UFC, unités formant colonie ; CF, cellules filtrables.

20 jours ont été retrouvés. La coloration de Gram a montré qu'il s'agissait bien de germes à Gram négatif très pléomorphes, comprenant de très petits corpuscules ronds associés à des bacilles.

### Modifications métaboliques

Après un an d'incubation dans l'eau de mer, d'importantes modifications biochimiques ont été notées chez toutes les souches testées après leur isolement des microcosmes d'eau de mer (Tableau II). Une activité  $\beta$ -galactosidase, absente chez la plupart des salmonelles (Le Minor, 1989), est apparue, alors que l'activité arginine dihydrolase, normalement présente chez les souches lors de leur inoculation, a disparu dans la plupart des cas. Certains sérotypes (*S. wien*, *S. livingstone*, *S. virginia*) ont développé une activité uréasique, non détectable au début des tests. Comme chez *S. paratyphi* B (Bakhrouf *et al.*, 1992), les 15 sérotypes analysés sont devenus capables de dégrader le glucose par la voie butanediolique avec formation d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer positive) alors que ce caractère est réputé absent chez les salmonelles. Dans de rares cas, des colonies capables de réduire les nitrates en azote ont été observées. Il est important de noter que les caractères originels des souches étaient restaurés par plusieurs repiquages sur GN.

Les 15 sérotypes étudiés ont conservé le même profil de résistance aux antibiotiques après une année d'incubation en eau de mer (données non présentées).

## DISCUSSION

Les modifications morphologiques observées pour les 15 sérotypes de salmonelles testés étaient analogues à celles décrites pour *E. coli* (Munro *et al.*, 1987), *S. typhimurium* (Morita, 1982) et *S. paratyphi* B (Bakhrouf *et al.*, 1990). Elles ont conduit à l'apparition de cellules naines capables de traverser les

membranes à pores de 0,45  $\mu$ m, telles que celles qui sont utilisées pour la stérilisation des liquides à usage médical ou pour le dénombrement des bactéries des eaux. Il s'agit donc d'un important écueil au dénombrement et à la recherche des germes à intérêt sanitaire dans les milieux naturels, soupçonnés dès 1962 par Brisou. Ce biais est particulièrement important dans le cas des salmonelles car leur recherche nécessite une étape initiale de concentration des échantillons par filtration. L'existence de microformes bactériennes dans les milieux aquatiques n'est toutefois pas spécifique des bactéries d'origine entérique. Elle est fréquente dans les eaux douces et marines oligotrophes (Morita, 1982) et considérée comme le résultat d'une adaptation normale de la microflore bactérienne à la carence alimentaire (Morita, 1982 ; Kjelleberg *et al.*, 1987).

L'évolution du profil biochimique, qui implique l'apparition ou la disparition de certaines activités enzymatiques, résulte de processus métaboliques et génétiques encore inconnus. Son explication demeure encore très spéculative. Elle est sans doute une conséquence de la pression exercée par les nouvelles conditions environnementales sur l'activité des cellules et, au plan le plus fondamental, sur l'expression de leur génome. On sait que la synthèse d'enzymes d'adaptation dépend des substrats mis à la disposition des bactéries dans un nouveau milieu et que, selon le principe d'économie, l'adaptation à une situation donnée s'accompagne généralement de la perte des fonctions devenues inutiles. Par ailleurs, il a été montré au cours des cinq dernières années que les situations de stress, et plus particulièrement la carence nutritionnelle, ont un fort effet inducteur sur l'expression de nombreux gènes silencieux dans les conditions de croissance exponentielle (Jenkins *et al.*, 1988, 1990 ; Matin, 1991 ; McCann *et al.*, 1991 ; Juper-Jaan *et al.*, 1992 ; Hengge-Aronis, 1993). Il est donc possible que les activités enzymatiques qui apparaissent dans l'eau de mer résultent de l'activation de gènes qui ne sont pas exprimés dans les milieux de culture et les

Tableau II - Modification des caractères phénotypiques des 15 sérotypes de *Salmonella* étudiés après différentes périodes d'incubation dans l'eau de mer (système API 20E<sup>a</sup>). / Alteration of the phenotypical traits of the 15 selected serotypes of *Salmonella* in seawater (API 20E system).

n° souche	Période d'incubation en eau de mer (mois)	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
S1	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	12	(+)	(+)	-	-	+	-	-	-	-	-	(+)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	13	+	(+)	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
S2	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	12	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
S3	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	12	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
S4	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	13	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
S5	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	13	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	(+)	+	+	-	-	+	+	-	+	-
S6	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	12	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
S7	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	12	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

PHÉNOTYPE DES SALMONELLA EN EAU DE MER / SALMONELLA PHENOTYPE IN SEAWATER

Tableau II (suite) - Modification des caractères phénotypiques des 15 sérotypes de *Salmonella* étudiés après différentes périodes d'incubation dans l'eau de mer (système API 20E<sup>a</sup>). / Alteration of the phenotypical traits of the 15 selected serotypes of *Salmonella* in seawater (API 20E system).

n° souche	Période d'incubation en eau de mer (mois)	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
S8	0	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
	7	-	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
S9	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
	12	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
S10	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
S11	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
	12GC <sup>b</sup>	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
	12PC <sup>b</sup>	-	(+)	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
S12	0	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	-	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	(+)	-	-	-	+	-
	12	-	+	+	+	+	+	-	(+)	-	+	-	+	+	-	+	+	-	(+)	-	-	-	+	-
S13	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	7	-	(+)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
	12	(+)	-	(+)	+	(+)	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S14	0	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
S15	0	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	7	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	12	+	+	-	-	+	-	-	(+)	(+)	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

<sup>a</sup>ONPG, β-galactosidase ; ADH, arginine dihydrolase ; LDC, lysine décarboxylase ; ODC, ornithine décarboxylase ; CIT, utilisation du citrate ; H<sub>2</sub>S, production de sulfure d'hydrogène ; URE, uréase ; TDA, tryptophane désaminase ; IND, production d'indole ; VP, production d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer) ; GEL, liquéfaction de la gélatine ; production d'acide en présence de glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY), arabinose (ARA) ; OX, oxydase ; NO<sub>2</sub>, réduction des nitrates en nitrites ; N<sub>2</sub>, réduction des nitrates en azote. (+), positif tardivement (48 à 72 h à 37°C).

<sup>b</sup>GC : grandes colonies ; PC, petites colonies.

conditions de laboratoire. Certaines activités métaboliques sont effectivement induites chez les entérobactéries dans les milieux salés (Brisou, 1980). Ici encore, cette dérive n'est pas particulière aux germes entériques : un changement très significatif du phénotype de bactéries marines hétérotrophes à Gram négatif soumises à des repiquages successifs sur des milieux traditionnels après leur isolement a été rapporté récemment (Grimes et al., 1993). Quels que soient les mécanismes mis en jeu chez les espèces entériques et leur analogie avec ceux qui sont développés par les bactéries marines, on peut voir là un exemple supplémentaire du potentiel adaptatif des bactéries d'origine humaine, pathogènes ou non, dans des milieux qui leur sont *a priori* particulièrement hostiles.

Sur un plan plus pratique, les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent que le séjour des salmonelles dans l'eau de mer peut conduire à une sous-estimation de leur nombre à la fois par biaisage de leur caractérisation phénotypique et par défaut de concentration. Les modifications biochimiques observées touchent en effet à des caractères clés utilisés pour leur identification. Ainsi, la production d'azote à partir des nitrates est un caractère qui est suffisant pour éliminer ces salmonelles de la famille des Entérobactéries. La production d'acétoïne, la présence d'une uréase et, dans une certaine mesure, de  $\beta$ -galactosidase conduisent également à l'exclusion des souches du genre *Salmonella*. De telles modifications phénotypiques rendent donc plus aléatoire le dénombrement des salmonelles par la méthode classique à partir d'échantillons d'origine marine, ce qui pose un problème épidémiologique et sanitaire non négligeable.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bakhrouf-Ben Fedhila A., M. Jeddi, A. Boudabbous, M.J. Gauthier, 1990 - Production of filtrable minicells by *Salmonella paratyphi* B in seawater. *Microbios Lett.*, **43** : 123-129.
- Bakhrouf A., M. Jeddi, M.J. Gauthier, 1992 - Modification des caractères culturels et biochimiques du *Salmonella paratyphi* B après incubation dans l'eau de mer. *Can. J. Microbiol.*, **38** : 871-874.
- Barcina I., M. Gonzalez, J. Iriberry, L. Egea, 1989 - Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55** : 246-251.
- Brisou J., 1962 - Problèmes de la vie et de la survie des bactéries pathogènes dans le milieu marin. *Rev. Corps Santé Armées*, **3** : 501-525.
- Brisou J., 1980 - *Les bactéries marines*. Collection Biologie des milieux marins. Masson, Paris, pp 45-60.
- Chabbert Y.A., 1963 - *L'antibiogramme. Sensibilité et résistance aux antibiotiques*. Collection «Techniques de base». Editions de la Tourelle, Saint-Mandé, 230 pp.
- Chai T.J., 1983 - Characteristics of *Escherichia coli* grown in bay water as compared with rich medium. *Can. J. Microbiol.*, **45** : 1316-1323.
- Colwell R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Hug, L.M. Palmer, 1985 - Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment ; implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biol. Technol.*, **3** : 817-820.
- Colwell R.R., 1987 - From counts to clones. *J. appl. Bacteriol.*, Suppl., **63** : 1S-6S.
- Gauthier M.J., P. Thomas, P.M. Munro, 1989 - Modification de la structure des enveloppes et du contenu en protéines d'*Escherichia coli* en survie dans l'eau de mer. *Can. J. Microbiol.*, **35** : 843-849.
- Grimes D.J., D. Jacobs, P.R. Swartz, P.R. Brayton, R.R. Colwell, 1993 - Numerical taxonomy of gram-negative, oxidase-positive rods from Carcharhinid sharks. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **43** : 88-98.
- Henge-Aronis R., 1993 - Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, **72** : 165-168.
- Jenkins D.E., J.E. Schultz, A. Matin, 1988 - Starvation-induced cross-protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170** : 3910-3914.
- Jenkins D.E., S.A. Chaisson, A. Matin, 1990 - Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **172** : 2779-2781.
- Jouper-Jaan A., A.E. Goodman, S. Kjelleberg, 1992 - Bacteria starved for prolonged periods develop increased protection against lethal temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **101** : 229-236.
- Kjelleberg S., M. Hermanson, P. Marden, 1987 - The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria with emphasis of the marine environment. *A. Rev. Microbiol.*, **41** : 25-49.
- Le Minor L., 1989 - Salmonella. In : *Bactériologie médicale*, L. Le Minor, M. Véron (eds.), Médecine-Sciences Flammarion, Paris, pp. : 411-427.
- Matin A., 1991 - The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **5** : 3-10.
- McCann M.P., J.P. Kidwell, A. Matin, 1991 - The putative *s* factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **173** : 4188-4194.
- McKay A.M., 1992 - Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Lett. appl. Microbiol.*, **14** : 129-135.
- Morita R.Y., 1982 - Starvation survival of heterotrophs in the marine environment. *Adv. microbiol. Ecol.*, **6** : 171-198.
- Munro P.M., M.J. Gauthier, F. Laumond, 1987 - Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53** : 1476-1481.
- Munro P.M., M.J. Gauthier, V.A. Breittmayer, J. Bongiovanni, 1989 - Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55** : 2017-2024.
- Roszak D.B., D.J. Grimes, R.R. Colwell, 1984 - Viable but unculturable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.*, **30** : 334-338.
- Roszak D.B., R.R. Colwell, 1987 - Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51** : 365-379.
- Xu H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Atwell, D.J. Grimes, R.R. Colwell, 1982 - Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, **8** : 313-323.

Reçu en mai 1994 ; accepté en septembre 1994.  
Received May 1994; accepted September 1994.