

anses

alimentation, environnement, travail



Évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de *Pseudomonades* dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées)

Rapport

Octobre 2010

Édition scientifique





Évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de Pseudomonades dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées)

Rapport

Octobre 2010

Édition scientifique

Sommaire

COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL.....	5
LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES.....	6
GLOSSAIRE.....	7
I. INTRODUCTION.....	9
II. PSEUDOMONADES: GÉNÉRALITÉS	11
1. Taxonomie : état des lieux (octobre 2009).....	11
2. Caractéristiques des Pseudomonades.....	11
3. Écologie bactérienne	12
3.1. Habitat	12
3.2. Les biofilms.....	13
III. SURVIE ET CROISSANCE DES PSEUDOMONADES DANS LES EAUX	14
1. Survie et croissance dans les eaux.....	14
1.1. Eaux conditionnées	14
1.2. Eau de distribution publique (EDP)	15
2. Facteurs influençant les dynamiques spatio-temporelles des Pseudomonades dans les eaux...	15
2.1. La température	15
2.2. Le pH	16
2.3. La flore microbienne interférente.....	16
2.4. La composition minérale de l'eau	16
2.5. La lumière naturelle	16
2.6. La charge nutritive	17
2.7. Les désinfectants.....	17
IV. MÉTHODES D'ANALYSE	19
1. Méthode par culture sur milieu sélectif ou non.....	20
2. Autres méthodes de détection.....	20
V. PRÉSENCE DES PSEUDOMONADES DANS L'EAU DE DISTRIBUTION PUBLIQUE	21
1. Données internationales.....	21
1.1. Réseau de distribution publique	21

1.2. Réseau intérieur	22
2. Données Françaises.....	23
2.1. Réseau de distribution publique	23
2.2. Réseau intérieur	23
VI. PATHOGÉNICITE	24
1. Virulence et toxicité	24
2. Pouvoir épidémiogène.....	26
2.1. Association bactérie – maladie.....	27
2.2. Facteurs prédisposants	28
3. Relation dose-réponse	28
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
3.2. Autres espèces.....	29
4. Résistance aux antibiotiques.....	29
4.1. Résistance naturelle	30
4.2. Résistance acquise	30
VII. ÉVALUATION DES RISQUES SANITAIRES LIÉS A L'INGESTION DE PSEUDOMONADES VIA L'EAU DE DISTRIBUTION PUBLIQUE	31
1. Identification des dangers	31
2. Évaluation de l'exposition.....	31
3. Relation dose-réponse	32
4. Caractérisation du risque.....	33
VIII. SYNTHÈSE ET RECOMMANDATIONS.....	35
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
ANNEXE A : Taxonomie des Pseudomonades.....	60
ANNEXE B : Caractéristiques de Pseudomonas.....	71
ANNEXE C : Éléments d'interprétation des données extraites de la base SISE-Eaux.....	72
ANNEXE D : Méthodes d'analyse.....	80
ANNEXE E : Facteurs de Virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	84

Composition du groupe de travail

Membres :

M. Philippe HARTEMANN, président

Université Henri Poincaré, Nancy 1
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

M. Benoît COURNOYER

CNRS, Lyon
Personnalité compétente auprès de l'Afssa

Mme Sylvie DUBROU

Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

M. Benoît GASSILLOUD

Laboratoire d'études et de recherches en hydrologie de l'Anses, Nancy
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

M. Michel JOYEUX

Eau de Paris
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

Mme Françoise LERICHE

VETAgro Sup, Clermont Ferrand
Personnalité compétente auprès de l'Afssa

M. Yves LÉVI

Université Paris Sud 11
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

M. Patrick MONFORT

CNRS, Montpellier
Personnalité compétente auprès de l'Afssa

Appui scientifique et technique pour l'exploitation des données de la base SISE-Eaux :

M. Laurent GUILLIER et Mme Françoise GAUCHARD

Anses- Direction Santé Alimentation
Unité d'appréciation quantitative du risque et épidémiologie en microbiologie et santé animale

Relecteurs :

M. Pierre LE CANN

École des Hautes Études en Santé Publique, Rennes
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

Mme Michèle VIALETTE

Institut Pasteur de Lille
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

Coordination scientifique :

Mme Gwenn VO VAN-REGNAULT

Anses – Direction Santé Alimentation
Unité d'évaluation des risques liés à l'eau

Liste des sigles et acronymes

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Anses : Agence nationale chargée de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (issue de la fusion de l'Afssa et de l'Afsset le 1^{er} juillet 2010)

Bcc : *Burkholderia* du complexe *cepacia*

CRECEP : Centre de recherche d'expertise et de contrôle des eaux de Paris

DL50 : dose létale 50%

EDCH : Eau destinée à la consommation humaine, qui comprend notamment, au sens du code de la santé publique (article R1321-1), les eaux de distribution publique et les eaux conditionnées (hors eaux minérales naturelles)

EDP : Eau de distribution publique

InVS : Institut national de veille sanitaire (France)

LPS : lipopolysaccharides

OMS : Organisation mondiale de la santé

UFC : Unité formant colonie

US-EPA : agence américaine de protection de l'environnement

VNC : viable - non cultivable

Glossaire

B. cepacia : *Burkholderia cepacia*

B. pseudomallei : *Burkholderia pseudomallei*

Bactérie viable-non cultivable : bactérie ayant perdu sa capacité à se multiplier mais ayant conservé une activité métabolique mesurable par des approches cellulaires. Elles ne sont pas détectées par les méthodes d'analyse basées sur la culture. Le devenir des cellules VNC fait encore l'objet de discussions, notamment en ce qui concerne leur aptitude à retrouver une capacité à se multiplier et, pour les agents pathogènes à conserver leur pouvoir de virulence.

Biofilm : communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, etc.) adhérant entre eux, fixée à une surface et caractérisée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.

Bioremédiation : décontamination de déchets organiques provenant du sol au moyen d'utilisation de techniques issues de la dégradation chimique ou d'autres activités d'organismes du sol.

Burkholderia du complexe cepacia ou Bcc : complexe d'environ 18 espèces bactériennes du genre *Burkholderia* classées sous l'appellation *Burkholderia cepacia* par les méthodes d'analyse phénotypique utilisées en milieu clinique

Espèce procaryote: unité de base de la classification bactérienne. Elle constitue une catégorie qui rassemble des individus (isolats/souches) génotypiquement cohérents et qui présentent un haut degré de similitudes pour différents caractères comparés sous conditions standardisées.

Gram : coloration des cellules permettant de distinguer deux catégories de bactéries selon les caractéristiques de leur paroi cellulaire.

Oligotrophe : qualifie un milieu pauvre en éléments nutritifs.

Pathovar : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par son pouvoir pathogène.

Pseudomonades : micro-organismes appartenant au genre *Pseudomonas* au sens taxonomique et aux micro-organismes dits « apparentés ». Ces derniers présentent des caractéristiques phénotypiques similaires et sont couramment dénombrés conjointement avec les *Pseudomonas* sur les milieux usuels de dénombrement mais sont exclus du genre *Pseudomonas* sur la base d'analyses génotypiques.

Psychrophile : se rapporte aux organismes ayant une température optimale de croissance inférieure à 16°C et ne se multipliant plus au-delà de 20°C.

Sidérophores : macromolécules chélatrices des ions ferriques qui sont synthétisées en réponse à une carence en fer du milieu de culture.

S. maltophilia : *Stenotrophomonas maltophilia*.

S. paucimobilis : *Sphingomonas paucimobilis*.

sp. (Indiqué après le genre d'un micro-organisme) : abréviation de *species* au singulier utilisée pour indiquer une espèce particulière du genre mais non déterminée.

spp. (Indiqué après le genre d'un micro-organisme) : abréviation de *species* au pluriel pour indiquer toutes les espèces du genre.

Taxon (ou unité taxonomique ou groupe taxonomique) : groupe d'organismes apparentés appartenant à un même rang hiérarchique.

Taxonomie : science ayant pour objet la classification des êtres vivants en groupes de similitude ou taxons.

Thermophile : se rapporte aux organismes dont la température optimale de croissance se situe entre 55 et 80°C

Toxicité bactérienne : aptitude à produire des molécules toxiques pour l'hôte, à savoir des endotoxines qui sont caractéristiques de l'espèce et/ou des exotoxines sécrétées à l'extérieur de la bactérie.

Virulence : aptitude d'un micro-organisme à coloniser un hôte, l'Homme dans le cas de ce rapport, à se multiplier au sein de cet hôte et à provoquer des manifestations infectieuses. Le caractère virulent d'un agent infectieux est multifactoriel et fait référence aussi bien aux capacités d'acclimatation aux variables de l'hôte (*e.g.* température, barrières immunitaires) qu'à la production de métabolites ou enzymes extracellulaires permettant sa multiplication et provoquant certains symptômes infectieux.

I. Introduction

1. Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 11 avril 2008 par la Direction générale de la santé d'une demande d'évaluation des risques sanitaires liés aux *Pseudomonas* présents dans les eaux destinées à la consommation humaine, hors eaux conditionnées, pour la population générale et les populations sensibles dont les nourrissons.

2. Contexte et questions posées

D'un point de vue réglementaire, seul l'arrêté du 14 mars 2007¹ fixe une limite de qualité pour les *Pseudomonas aeruginosa* en exigeant leur absence pour 250 mL dans les eaux conditionnées. Les eaux minérales naturelles et de source conditionnées sont définies par le code de la santé publique comme des eaux d'origine souterraine, microbiologiquement saines et protégées contre les risques de pollution (articles R1321-84 et R1322-2). Pour ces types d'eau tout traitement de désinfection est interdit. Le paramètre *Pseudomonas aeruginosa* qui doit être recherché aussi bien à l'émergence qu'au cours de la commercialisation permet de s'assurer de l'absence de contamination du captage jusqu'au produit fini. Ce paramètre est un indicateur permettant de s'assurer du bon entretien des installations de captage, de transport et de traitement et du maintien de la qualité microbiologique de l'eau.

Dans ce type d'eau, aucune limite n'est fixée pour les autres espèces appartenant au genre *Pseudomonas*.

En 2010, il n'existe aucune valeur réglementaire relative aux *Pseudomonas spp.* et à *P. aeruginosa* dans les eaux destinées à la consommation humaine non conditionnées. Des protocoles d'autosurveillance ont néanmoins conduit à la détection, à l'identification et au dénombrement de *Pseudomonas* dans les eaux de distribution publique et dans les réseaux intérieurs notamment hospitaliers. En milieu hospitalier, une valeur seuil a été définie pour des types d'eaux, des usages et des patients spécifiques (absence de *P. aeruginosa* pour 100 mL), mais pas pour l'eau de distribution publique utilisée pour la boisson (Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005).

L'objectif de ce travail est de réaliser un état des connaissances sur les risques sanitaires liés aux *Pseudomonas spp.* par ingestion d'eau afin d'effectuer, avec les données actuellement disponibles, une évaluation des risques liés à la présence de ces bactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées).

Dans ce rapport, le terme « Pseudomonades » sera préféré à *Pseudomonas spp.* car l'utilisation de ce terme permet de prendre en compte l'ensemble des micro-organismes appartenant au genre *Pseudomonas* au sens taxonomique et les micro-organismes dits « apparentés ». Ces derniers présentent des caractéristiques phénotypiques similaires et sont couramment dénombrés conjointement avec les *Pseudomonas* sur les milieux usuels de dénombrement mais sont exclus du

¹ Arrêté du 14 mars 2007 relatif aux critères de qualité des eaux conditionnées, aux traitements et mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique, transposant en droit français les directives européennes 98/83/CEE et 2009/54/CE.

genre *Pseudomonas* sur la base d'analyses génotypiques. Il s'agit par exemple des *Burkholderia* du complexe *cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Le terme *Pseudomonas spp.* sera néanmoins utilisé lorsqu'il est mentionné dans les publications prises en référence.

3. Méthode d'expertise suivie par le groupe de travail

À la demande du Comité d'Experts Spécialisé « Eaux », l'Afssa a créé, le 27 avril 2009, un groupe de travail chargé d'évaluer les risques sanitaires liés à l'ingestion de Pseudomonades présents dans les eaux de distribution publique, pour la population générale et les populations sensibles dont les nourrissons. La progression du travail du groupe a fait l'objet d'une présentation régulière auprès du comité d'experts spécialisé « Eaux » de l'Afssa. Le présent rapport a été adopté par ce comité le 6 juillet 2010.

L'expertise a nécessité l'extraction d'informations relatives à la qualité des eaux distribuées en France à partir de la base nationale de données SISE-Eaux (Système d'Information en Santé-Environnement sur les Eaux). Cette base de données du ministère chargé de la santé rassemble les résultats du contrôle sanitaire des eaux d'alimentation et bien que les Pseudomonades ne soient pas un paramètre du contrôle sanitaire des eaux, des résultats d'analyses sont disponibles.

II. Pseudomonades : généralités

1. Taxonomie : état des lieux (octobre 2009)

Seules quelques études de large envergure sont disponibles pour une classification des Pseudomonades. Ce sont celles présentées par Kesters *et al.* (1996b) et par Anzai *et al.* (2000) qui font actuellement référence

Depuis sa création en 1894, le genre *Pseudomonas* a subi de nombreux remaniements. Les *Pseudomonas stricto sensu* appartiennent aujourd'hui à la sous classe γ des *Proteobacteria*, tandis que les « ex *Pseudomonas* » ont été répartis dans les sous-classes α des *Proteobacteria* (ex : *Brevundimonas*), β , des *Proteobacteria* (ex : *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Comamonas* ou *Hydrogenophaga*); γ - β des *Proteobacteria* (ex : *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*).

A priori, la délimitation du genre *Pseudomonas* est à peu près aboutie et l'éviction massive d'espèces est achevée pour l'instant bien que la classification des espèces au sein du genre souffre encore de nombreuses ambiguïtés. Par contre, de nouveaux isolats sont fréquemment candidats au positionnement au sein des *Pseudomonas* enrichissant ainsi le genre d'une dizaine de nouvelles espèces par an environ. Le genre *Pseudomonas* compte actuellement environ 150 espèces répertoriées.

L'annexe A détaille la classification des Pseudomonades.

2. Caractéristiques des Pseudomonades

Les caractéristiques des Pseudomonades sont décrites dans l'ouvrage « Bergey's » (Garrity, 2005). Ce groupe renferme des bacilles à coloration de Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 1,5 à 5,0 μm (ou plus) de longueur, non sporulés. Ces bactéries sont très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires.

Dans leur grande majorité, elles produisent des sidérophores : pyocyanine, pyorubine, chlororaphine, oxyphénazine. Certaines de ces molécules sont considérées comme caractéristiques d'espèce telle la pyocyanine, pigment vert-bleu de *P. aeruginosa*,

Ces bactéries sont aérobies, à métabolisme strictement respiratoire. Globalement, toutes sont capables de se multiplier à 28°C et pour des valeurs de pH supérieures à 4,5. Néanmoins, certaines sont considérées psychrophiles et d'autres thermophiles. Leur caractéristique majeure reste toutefois la diversité et la pluralité des substrats carbonés qu'elles sont capables d'utiliser et leur richesse en enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, estérases, etc.).

Cette description restrictive des caractéristiques prédominantes de ces micro-organismes masque l'extrême diversité phénotypique qui règne au sein du seul genre *Pseudomonas*. En effet, si plus de 150 espèces ont maintenant été différenciées grâce à l'apport des techniques de la phylogénétique moléculaire, nombreux sont les auteurs qui décrivent l'extraordinaire pouvoir adaptatif de ces germes faisant de chaque isolat un micro-organisme original. Le remarquable potentiel génétique et physiologique adaptatif de ces bactéries se traduit par des propriétés de résistance à de nombreux antibiotiques, à certains agents chimiques et physiques (biocides, sels de bore, de chrome et métaux lourds, rayonnements ultraviolets, etc.), aux bactériophages et à certaines bactériocines. D'après Spiers *et al.* (2000) cette capacité d'adaptation est responsable de la distribution universelle de ces espèces dans les environnements naturels et élaborés.

L'annexe B détaille les caractéristiques des *Pseudomonas*.

3. Ecologie bactérienne

3.1. Habitat

Les Pseudomonades sont largement distribués et peuvent être retrouvés dans une grande majorité des écosystèmes terrestres à l'exception de certains milieux extrêmes (Coenye et Vandamme, 2003; Lambert *et al.*, 1990; Peix *et al.*, 2009). Ils ont une grande capacité à survivre et se multiplier dans des conditions hostiles telles que des milieux oligotrophes et présentent un tropisme naturel pour les milieux hydriques (Leclerc et Moreau, 2002).

Les espèces d'intérêt clinique peuvent survivre, voire se multiplier, dans les sols et les milieux hydriques sous forme libre ou en association avec d'autres organismes. Il existe néanmoins peu de bilans de la répartition spatiale des Pseudomonades et il est donc difficile de préciser l'habitat naturel de la majorité de ces espèces. La littérature scientifique donne toutefois quelques indications sur la répartition de certaines espèces.

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce la plus étudiée en termes de répartition géographique et d'habitats préférentiels (Pirnay *et al.*, 2009). Sous forme libre, *P. aeruginosa* semble peu compétitif dans les sols mais montre un certain tropisme pour les milieux hydriques. En effet, les capacités de *P. aeruginosa* à survivre en milieu oligotrophe, à se développer dans les biofilms et à résister à de nombreuses substances actives dont des biocides lui confèrent un fort potentiel de colonisation des surfaces humides. Ainsi, *P. aeruginosa* est associé aux canalisations de nature variée constituant les réseaux d'eaux de distribution publique (EDP) et d'eaux usées, à la robinetterie et aux siphons, aux objets et linge de toilette des environnements hospitaliers ou non-hospitaliers, aux dispositifs médicaux contenant des liquides (e.g. humidificateurs des respirateurs artificiels).

P. aeruginosa peut être présent dans des eaux résiduaires, des eaux de surface, des eaux destinées à la consommation humaine (eaux du réseau de distribution publique et eaux conditionnées), des eaux récréatives, des eaux de bain tourbillon et de spa insuffisamment traitées, ou des eaux distillées (Mena et Gerba, 2009).

P. aeruginosa peut également contaminer certains produits alimentaires tels que le lait cru ou le fromage (Gennari et Dragotto, 1992). Plusieurs études ont montré la présence possible de *P. aeruginosa* dans des légumes. C'est le cas notamment de salades qui après lavage peuvent présenter des concentrations en *P. aeruginosa* supérieures à 10^3 UFC/g (Dejli *et al.*, 2000 ; Soriano *et al.*, 2000 ; Correa *et al.*, 1991). En 2005, Curran *et al.* ont analysé 15 échantillons de champignons achetés dans le commerce et ont trouvé *P. aeruginosa* à des concentrations comprises entre $4,8 \cdot 10^4$ et $3,6 \cdot 10^7$ UFC/g.

Les propriétés de virulence de *P. aeruginosa* lui donnent une capacité de croissance au détriment de nombreux hôtes dont l'Homme. Il s'agit de l'espèce de ce genre la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme en portage sain, au niveau du tractus digestif, de la voie oto-rhino-laryngologique (ORL) et de la peau (les mains). Néanmoins, l'incidence de colonisation chez l'Homme sain est assez faible, ainsi, cette espèce peut être isolée dans les fèces de 2 à 8% de la population générale (Hardalo et Edberg, 1997).

- ***Autres Pseudomonades***

En ce qui concerne les autres Pseudomonades, les *P. fluorescens* peuvent coloniser la rhizosphère des végétaux, les eaux douces (Peix *et al.*, 2009) et les eaux souterraines (Messi *et al.*, 2005). Les *P. putida* peuvent être retrouvés dans la flore de l'oropharynx, dans les sols, et dans les eaux continentales et les eaux souterraines (Messi *et al.*, 2005). Ces deux espèces sont psychrophiles

peuvent être retrouvées dans certaines eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), et certains aliments.

P. stutzeri a été isolé du sol, de la paille, de l'humus, d'eaux stagnantes et d'eaux souterraines (Messi *et al.*, 2005). Cette espèce peut contaminer certains produits cosmétiques.

Les *Burkholderia* du complexe *cepacia* (Bcc) et *S. maltophilia* ont été principalement détectées dans les sols (Hagedorn *et al.*, 1987) et les rhizosphères, mais quelques études font également état de leur présence en milieux aquatiques et notamment dans les eaux souterraines (Berg *et al.*, 2005; Coenye et Vandamme, 2003; Messi *et al.*, 2005; Wilkinson et Kerr, 1998). L'espèce *Burkholderia cepacia* du Bcc est un phytopathogène reconnu de l'oignon. Certaines Bcc montrent une bonne aptitude à survivre et à se multiplier dans les solutions de biocides (Rose *et al.*, 2009). Les Bcc et *S. maltophilia* ont été utilisés en bioremédiation. Des moratoires nord-américains limitent l'utilisation des Bcc en agriculture en raison des dangers sanitaires associés (Balandreau et Mavingui, 2007).

En 1992 en Italie, Gennari et Dragotto (1992) ont recherché des *Pseudomonades* fluorescents dans 182 échantillons provenant de l'environnement et d'aliments. Les concentrations de *Pseudomonades* observées étaient les suivantes : dans les viandes fraîches de 10^4 à 10^6 UFC/g, dans les viandes altérées de 10^8 à 10^{11} UFC/g ; dans les poissons frais de 10 à 10^5 UFC/g, dans les poissons altérés de 10^5 à 10^7 UFC/g ; dans les laits crus de 10^3 à 10^6 UFC/g ; dans les fromages et le beurre de 10^2 à 10^3 UFC/g mais quelques échantillons présentaient une concentration supérieure à 10^8 UFC/g. Dans cette étude ancienne les *Pseudomonades* ont été dénombrés à des concentrations allant de 10 à 10^6 UFC/g dans les sols et de 10 à 10^5 UFC/g dans les eaux de surface mais les méthodes utilisées suggèrent que c'est bien l'ensemble des *Pseudomonades* qui a été dénombré. Les concentrations en *Pseudomonades* sont, bien sûr, très variables selon la nature de l'aliment et le processus de transformation mais globalement, les chiffres présentés ci-avant sont cohérents avec les quelques données publiées ultérieurement. Il convient de préciser que malgré des niveaux de contamination qui apparaissent élevés, aucune toxi-infection alimentaire liée à un ou des *Pseudomonades* n'a été déclarée à ce jour en France (voir chapitre VI).

En raison du faible nombre d'études sur les habitats de ces bactéries, il est possible que des sources majeures d'exposition à ces organismes demeurent non-référencées.

3.2. Les biofilms

La littérature sur les liens entre la constitution de biofilms dans les réseaux et les structures de distribution de l'EDP et la présence de *Pseudomonades* est assez restreinte. Il est néanmoins établi, à l'aide d'essais menés en laboratoire, que les *Pseudomonades* sont capables de former des biofilms sur des matériaux tels que le polychlorure de vinyle (PVC) (Vess *et al.*, 1993), le verre (Rao *et al.*, 1997) ou l'acier inoxydable (Percival *et al.*, 1998). Ces derniers auteurs ont étudié l'aptitude de 2 types d'aciers inoxydables (aciers 304 et 316) à promouvoir la croissance microbienne à l'aide d'un réseau pilote alimenté en eau potable et simulant les conditions de gestion d'un réseau de distribution. Les essais ont été réalisés à 3 vitesses de circulation de l'eau : 175, 96 et 32 cm/s. Après 5 mois de circulation, il apparaît que *Pseudomonas spp.* représente entre 56 et 93 % des genres identifiés dans les biofilms constitués sur les aciers 304 et 316. La vitesse de l'eau n'a pas semblé jouer un rôle significatif sur la capacité des *Pseudomonas spp.* à coloniser les matériaux. Koenig *et al.* (1995) avait montré que l'augmentation du débit de l'eau dans le réseau réduit le flux d'attachement de *Burkholderia cepacia* sur une surface de verre (cellules/heures).

Emtiazi *et al.* (2004) détectent *P. aeruginosa* dans des biofilms d'un réseau de distribution d'EDP produite à partir d'eau de surface. En revanche, en analysant le biofilm présent sur des boucles de canalisations d'une installation pilote alimentées en eau potable, Wingender et Flemming n'ont jamais pu détecter *P. aeruginosa* ni *B. cepacia* par culture. D'autres *Pseudomonades* ont néanmoins été détectés dans les biofilms à des teneurs faibles de l'ordre de 0,1 UFC/cm² et 440 UFC/cm² sur de l'acier et de 6,1 à 240 UFC/cm² sur du polychlorure de vinyl (PVC) et du polyéthylène. *P. fluorescens*

est le plus fréquemment retrouvé avec *P. stutzeri*, *P. putida* et *P. mendocina*. Les auteurs suggèrent qu'un réseau bien entretenu et en bon état de fonctionnement ne contribue pas à la prolifération de *P. aeruginosa* (Wingender et Flemming, 2004).

Pour étudier le devenir de souches de *P. aeruginosa* introduites dans un réseau pilote, Bressler *et al.* (2009) contaminent un réseau en élastomère (EPDM : Éthylène propylène diène monomère) colonisé au préalable par un biofilm naturel pendant 14 jours et montrent que *P. aeruginosa* est capable de coloniser un biofilm structuré par des populations de bactéries issues d'eau potable et survivre pendant au moins 5 semaines.

Moritz *et al.* (2010) ont mené la même expérience avec des tuyaux en EPDM, en polyéthylène réticulé (PE Xb) et en cuivre. *P. aeruginosa* survit plusieurs semaines dans le biofilm de tuyaux en EPDM ou en PE Xb, principalement sous forme viable-non cultivable. En revanche, les tuyaux en cuivre ne sont pas colonisés.

Dans leur étude réalisée en Pologne Grabinska-Lionevska *et al.* (2007), montrent que la fréquence d'isolement de *Pseudomonas sp.* dans les réseaux augmente avec la distance par rapport à l'usine de potabilisation et que ce phénomène n'est pas dû à une croissance dans la phase liquide, mais à une croissance au sein des biofilms colonisant le réseau.

L'Homme est exposé aux Pseudomonades via différentes sources tels que l'eau de distribution publique, les eaux conditionnées, les eaux récréatives ou les aliments.

La présence de ces bactéries dans l'eau de distribution publique est liée à leur tropisme naturel pour les milieux hydriques mais aussi à la colonisation de canalisations, notamment en cas de mauvaise conception ou d'entretien défectueux des réseaux privés.

III. Survie et croissance des Pseudomonades dans les eaux

1. Survie et croissance dans les eaux

Les études disponibles sur la survie et la croissance des Pseudomonades dans les EDCH concernent principalement les eaux conditionnées.

1.1. Eaux conditionnées

Legnani *et al.* (1999) ont inoculé deux souches de *P. aeruginosa* dans des eaux minérales non gazeuses et filtrées (à 0,45 µm), conservées entre 19°C et 24°C. Ils montrent qu'une des souches était encore viable et détectable par culture cinq ans après l'inoculation. Ces auteurs décrivent 3 phases distinctes dans la survie de ces bactéries dans ces milieux:

- une première phase de multiplication importante des micro-organismes avec une augmentation de l'ordre de 3 log après 4 à 5 jours,
- une seconde phase correspondant à une stabilisation du nombre de bactéries dans l'eau observée pendant les 70 à 100 jours suivants,
- enfin une décroissance très lente de la quantité de bactéries dans le milieu, jusqu'à la mort d'une des souches après 5 ans de stockage.

La croissance de *P. aeruginosa* dans des eaux de sources conditionnées a également été démontrée par Tamagnini et Gonzalez (1997).

Wilkinson et Kerr (1998) montrent que les *S. maltophilia* peuvent également se multiplier dans des eaux conditionnées non gazeuses et filtrées.

Pour Vachée *et al.* (1997), les Pseudomonades ne feraient que survivre dans les eaux conditionnées et seraient incapables de se multiplier. Cela est également relaté par Teixeira *et al.* (2001), qui observent dans des expérimentations de survie, après inoculation d'une souche de *P. aeruginosa* dans des eaux conditionnées, une perte du nombre de bactéries cultivables au cours du temps selon la condition testée.

1.2. Eau de distribution publique (EDP)

Après inoculation dans des EDP préalablement filtrées sur un support de porosité 0,22 µm et conservées à 25°C, des *Pseudomonas spp.* peuvent survivre plus de 90 jours (Byrd *et al.*, 1991). Plusieurs études ont montré qu'il existait, selon la souche de Pseudomonades considérée, des différences de comportement dans l'environnement ou vis-à-vis de composés chimiques. Les travaux de Lavenir *et al.* (2008) sur *P. aeruginosa* ou de Van der Kooij *et al.* (1982) sur *P. Fluorescens* illustrent ce point. Ces derniers observent un comportement différent vis-à-vis de l'assimilation de sources carbonées de deux biotypes distincts de *P. fluorescens* isolés d'EDP produite à partir d'une nappe d'eau souterraine ou après traitement d'une eau de surface. Ainsi, selon la composition chimique des eaux, leur origine et les voies d'assimilation des souches considérées, des comportements distincts pourront être constatés.

2. Facteurs influençant les dynamiques spatio-temporelles des Pseudomonades dans les eaux

La dynamique d'une population bactérienne dans l'eau, qui peut être traduite par sa croissance dans le milieu, dans l'espace et/ou le temps, est fonction de facteurs biotiques et abiotiques. Leur influence peut être différente selon que la bactérie est dans un biofilm ou dans la phase liquide (bactérie planctonique).

2.1. La température

La température constitue le principal facteur physique pouvant influencer la survie et la multiplication des Pseudomonades dans les eaux. Schmidt-Lorentz *et al.* (1990) ont montré sur 25 isolats provenant d'eaux conditionnées que la température optimale de croissance se situerait pour des souches non psychrophiles entre 20 et 32°C. L'augmentation de la température déstabilise la structure membranaire des parois bactériennes et entraîne la mort cellulaire. À l'inverse, des températures relativement faibles mais non négatives, permettront une survie des souches de Pseudomonades. À des températures inférieures à 0°C une inactivation bactérienne peut se produire également par le biais d'une destruction des parois bactériennes. Il est à noter que la température dans un milieu donné peut avoir une influence différente selon la souche de Pseudomonades considérée. Ainsi, à des températures inférieures à 10°C, certaines souches de *P. fluorescens* sont capables de se multiplier ce qui n'est pas le cas des *P. aeruginosa* dont la multiplication, à cette température, est considérablement ralentie voire inexistante. Il en est de même pour les souches de *S. maltophilia* qui peuvent se multiplier dans des eaux conditionnées non gazeuses filtrées à 22°C, 30°C et 37°C mais pas à 4°C (Wilkinson et Kerr, 1998).

La différence de comportement des Pseudomonades selon la température peut être mise à profit dans certaines conditions opératoires lors de diagnostics bactériologiques pour confirmer leur présence dans un milieu donné.

Miyano *et al.* (2003) ont montré que les *B. cepacia* sous forme planctonique ou de biofilm ont une sensibilité équivalente aux températures élevées. Ces deux formes sont éradiquées par un traitement de 15 secondes avec de l'eau chaude à 65°C.

2.2. Le pH

Les Pseudomonades sont capables de survivre et de se multiplier dans des eaux dont le pH est compris entre 6 et 8. Ainsi, la croissance de *S. maltophilia* serait optimale dans les eaux conditionnées à un pH de 7 à 7,5 (Wilkinson et Kerr, 1998). *P. aeruginosa* semble pouvoir s'adapter au pH alcalin (Heurlier *et al.*, 2005). En revanche, sa survie est faible en milieu acide (Garrity, 2005).

2.3. La flore microbienne interférente

La flore autochtone a un pouvoir antagoniste puissant vis-à-vis du développement de ces espèces (Moreira *et al.*, 1994; Vachee et Leclerc, 1995; Vess *et al.*, 1993). Des taux de survie plus importants sont observés pour les *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens* inoculés dans des eaux filtrées ou autoclavées (Kersters *et al.*, 1996; Tamagnini et Gonzalez, 1997; Teixeira *et al.*, 2001). Pour certains auteurs, ce phénomène serait dû à une forte compétition entre flore autochtone et *Pseudomonas* pour les sources de carbone mobilisables dans les eaux. Pour Van der Kooij *et al.* (1982), cette compétition pourrait expliquer la relativement faible proportion de Pseudomonades (moins de 1% des bactéries) retrouvés dans les eaux de surface, dans les eaux brutes ou dans les eaux de réservoir (Van der Kooij, 1992).

2.4. La composition minérale de l'eau

Les eaux présentant une concentration ionique importante favoriseraient la multiplication des bactéries. La survie des Pseudomonades est nettement moins importante dans des eaux distillées que dans des eaux fortement minéralisées. Le calcium et le magnésium joueraient un rôle important dans la stabilisation des parois bactériennes (Teixeira *et al.*, 2001). Borella *et al.* (2003) ont montré pour l'eau chaude domestique une corrélation entre la présence de *Pseudomonas spp.* et des concentrations élevées de calcium ou faible de fer mais en revanche aucune corrélation a été montrée avec le manganèse, le cuivre ou le zinc.

Notons que des souches de *Pseudomonas sp.* sont susceptibles de survivre dans des eaux de mer présentant une force ionique élevée (Kurath et Morita, 1983). Des génotypes particuliers de *P. aeruginosa* ont été identifiés dans les eaux japonaises de l'océan Pacifique (Khan *et al.*, 2008).

2.5. La lumière naturelle

En conditions expérimentales, la lumière naturelle aurait également un impact négatif sur la survie de ces bactéries (Teixeira *et al.*, 2001). L'effet inactivant de ce paramètre pourrait s'expliquer par la production de composés toxiques appartenant à des formes réactives de l'oxygène, type peroxyde d'hydrogène ou radicaux hydroxyles (Arana *et al.*, 1992; Gourmelon *et al.*, 1994).

2.6. La charge nutritive

Les Pseudomonades peuvent se multiplier dans des milieux oligotrophes tels que des eaux distillées ou désionisées (Kersters *et al.*, 1996). Une étude menée avec différents types de substrats carbonés a montré que 20 µg de carbone par litre suffisent à stimuler la croissance de *P. fluorescens* stockée dans des eaux d'alimentation à température ambiante (Van der Kooij *et al.*, 1982). Ces bactéries sont capables de mobiliser une très grande variété de composés organiques (acides aminés, acides carboxyliques, sucres et acides aromatiques).

2.7. Les désinfectants

L'évaluation de l'efficacité d'un traitement est relativement difficile à apprécier car de nombreux facteurs opératoires peuvent affecter la sensibilité et le dénombrement des bactéries tels que la température lors du test, la température d'incubation de la méthode de dénombrement, le milieu de croissance ou encore le pH du milieu dans lequel se trouvent les bactéries. En outre, ces bactéries sont plus sensibles aux désinfectants lorsqu'elles proviennent d'inocula bactériens produits en laboratoire par rapport à des inocula directement isolés de l'environnement (Koenig *et al.*, 1995; Lezcano *et al.*, 1999; Mena et Gerba, 2009).

Howard et Ingkis (2005) montrent que la présence dans le milieu d'autres micro-organismes tels que *Acanthamoeba astronyxis* augmente la résistance de *B. pseudomallei* aux désinfectants

L'efficacité des traitements est également liée au taux de fixation des bactéries sur les particules et/ou aux agrégats dans l'eau. Au sein d'un biofilm, la bactérie est protégée de l'action des désinfectants en raison de la viscosité du milieu (diffusion limitée des désinfectants) et de leur neutralisation par réaction avec les exopolymères constituant la matrice (Grobe *et al.*, 2001). Sagripanti et Bonifacio (2000) précisent que dans un biofilm les *P. aeruginosa* seraient environ 500 fois plus résistants aux désinfectants que lorsqu'ils sont en suspension. Tachikawa *et al.* (2009) montrent que les *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* sous forme de biofilm sont plus résistants à l'ozone que sous forme libre. De même, Peeters *et al.* (2008) montrent pour certains désinfectants une résistance plus élevée des *B. cenocepacia* sous forme de biofilm que sous forme libre. En revanche, Rose *et al.* (2009) ont observé pour les Bcc des niveaux similaires de sensibilité aux désinfectants pour les formes libres et en biofilm. Enfin, pour *P. aeruginosa*, une étude a montré que la cinétique de croissance et la capacité à former des biofilms diffèrent selon que la bactérie est planctonique, sous forme de biofilm ou détachée d'un biofilm. Cela peut avoir un impact sur l'activité des désinfectants (Rollet *et al.*, 2009).

La sensibilité aux désinfectants a principalement été étudiée pour *P. aeruginosa*. Plusieurs études sur la sensibilité ou la résistance d'autres Pseudomonades (PVP iodée, ammoniums quaternaires) démontrent une grande plasticité et l'aptitude à tolérer des concentrations croissantes de désinfectants (Miyano *et al.*, 2003).

• **Chlore libre**

L'étude de Shrivastava *et al.* (2004) montre que *P. aeruginosa* est plus résistant au chlore que d'autres bactéries hydriques dans la gamme des concentrations utilisées pour le traitement et la distribution de l'eau. Il est à noter cependant que des variations en termes de sensibilité au chlore en fonction des clones de *P. aeruginosa* ont été observées, rendant difficile toute généralisation. Lavenir *et al.* (2008), notamment, ont décrit des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'hypochlorite de sodium (1%). Il semble probable que des clones résistants de cette espèce seront graduellement sélectionnés si des traitements inappropriés sont mis en œuvre.

Plusieurs études s'intéressant à l'efficacité du chlore pour la désinfection des eaux de piscine ont montré que des traitements avec 0,5 mg/L de chlore pendant trois heures (Fitzgerald et DerVartanian, 1969) ou 1mg/L de chlore pendant 10 secondes (Aspinall et Graham, 1989) à 10 minutes (Borgmann-Strahsen, 2003) permettent une inactivation de *P. aeruginosa* supérieure ou égale à 4 log.

En 2003, Howard et Inglis montrent que *B. pseudomallei* est plus tolérant au chlore que *P. aeruginosa*. Un traitement par 1 mg/L de chlore pendant 10 à 20 minutes permet de diminuer le nombre de *B. pseudomallei* de 2 à 3 log mais ne les éradique pas. Ces mêmes auteurs en 2005 montrent pour une culture de *B. pseudomallei* à 10^6 UFC/mL une diminution de 4 log avec un traitement de 30 minutes par 1 mg/L de chlore et une diminution supérieure à 99% pour 10 mg/L de chlore (Howard et Inglis, 2005).

Gauthier et al. (1999), quant à eux, étudient l'inactivation de *Sphingomonas sp.* par le chlore et montrent que 1,1 mg/L de chlore permet une diminution du nombre d'UFC supérieure à 99,9%, que les bactéries soient libres ou fixées à des particules.

En ce qui concerne l'impact du résiduel de chlore dans les réseaux de distribution d'eau, l'exploitation des données de la base SISE-Eaux (annexe C) indique que les prévalences de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* sont significativement plus faibles dans les EDP lorsque la concentration résiduelle en chlore libre est supérieure à 0,3 mg/L.

Enfin, plusieurs études ont montrées que, comme pour d'autres bactéries, le chlore serait nettement moins efficace sur les Pseudomonades fixées dans les biofilms que sous forme planctonique. Ainsi, Vess et al. (1993), indiquent que des *P. aeruginosa* et *B. cepacia* colonisant les surfaces en polychlorure de vinyle (PVC) de canalisations sont retrouvés après une exposition pendant 7 jours à une concentration de chlore libre comprise entre 10 et 15 mg/L. Ces auteurs montrent que la capacité de ces bactéries à former des biofilms dans des canalisations en PVC augmente leur résistance au chlore libre. Koenig et al. (1995), quant à eux, ont étudié les effets de divers oxydants pour réduire la présence de *B. cepacia* dans les réseaux d'eau utilisés dans les navettes et la station spatiale internationale. Ils montrent qu'une heure de traitement continu avec 24mg/L de chlore est nécessaire pour éliminer 50% du biofilm colonisé par *B. cepacia* alors que la concentration de chlore nécessaire pour inactiver 50% des *B. cepacia* planctoniques est de 0,5 mg/L (10 min à 22°C).

- **Ozone**

Zuma et al. (2009) montrent, pour *P. aeruginosa*, une réduction de 1 log en 6 min pour une concentration en ozone de 9.10^{-4} mg/L et de 4 log en 2 minutes pour une concentration de $4,7.10^{-3}$ mg/L pour une population initiale d'environ 10^6 UFC/mL.

Lezcano et al. (1999) atteignent 90% d'inactivation en 8,33 minutes avec 0,39 mg/L d'ozone pour une souche sauvage de *P. aeruginosa*.

Restaino et al. (1995) indiquent qu'en 1 minute, une dose d'ozone de 0,64 à 0,188 mg/L provoque une réduction de 6 log de la concentration d'une suspension de *P.aeruginosa* immergées dans de l'eau désionisée.

Koenig et al. (1995), dans leur étude sur les réseaux d'eau utilisés dans les navettes et la station spatiale internationale, montrent que 2mg/L d'ozone pendant une heure de traitement continu est nécessaire pour éliminer 50% du biofilm colonisé par *B. cepacia* alors que 0,2 mg/L d'ozone (10 min à 22°C) permet d'inactiver 50% des *B. cepacia* planctoniques.

Tachikawa et al. (2009) étudient le taux d'inactivation de biofilms de *P. fluorescence* et *P. aeruginosa* selon la concentration d'ozone et le temps de contact (0,9 à 3,2 mg/L, 1 à 20 min). Ils montrent que l'ozone est efficace contre ces biofilms puisque 1mg/L d'ozone pendant 5 minutes inactive plus de 99% de ces deux types de biofilms. Néanmoins, la concentration efficace varie en fonction du biofilm ce qui est principalement lié à la réaction de l'ozone avec les constituants des biofilms.

- **Rayonnements ultraviolets (UV)**

Wolfe (1990) indique que *P. aeruginosa* est plus résistant aux rayonnements UV que les autres bactéries testées (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella sp.*, *Vibrio cholerae*, etc.). Ainsi, une dose de $5500 (\mu W.s)/cm^2$, soit $55 J/m^2$ est nécessaire pour inactiver 90 % d'une suspension de *P. aeruginosa*. Au contraire, Fernandez et Pizarro (1996) rapportent que les *P. aeruginosa* sont peu résistants aux

UV. Les UV sont responsables d'altération de l'ADN bactérien. Cependant ces bactéries possèdent un système de réparation à l'obscurité dans lequel plus d'une vingtaine de gènes sont impliqués. L'expression du gène *rec A* d'une souche de *P. aeruginosa* augmente 2 à 6 heures après la fin d'une exposition à des doses comprises entre 100 à 600 J/m². L'activation de ce système de réparation a été étudiée dans différents travaux dont ceux relatés par Jungfer *et al.* (2007). Ces auteurs indiquent qu'une activation métabolique est mesurée au sein de biofilms bactériens après un traitement UV ce qui n'est pas le cas après des traitements chimiques.

Emtiazi *et al.* (2004) détectent *P. aeruginosa* dans les biofilms des systèmes de production d'EDP directement après désinfection par des rayonnements UV et suggèrent une tolérance plus élevée des espèces sous forme de biofilm.

- **Autres désinfectants non autorisés en France pour le traitement de l'eau destinée à la consommation humaine**

La sensibilité des *P. aeruginosa* aux chloramines a été étudiée par Ward *et al.* (1984). Ces auteurs montrent que 10³ UFC/mL de cette espèce est inactivée à 99% par une dose de 1 mg/L appliquée pendant un temps de contact compris entre 4 et 9,5 minutes avec une inactivation plus rapide à pH 6 qu'à pH 8. À 3 mg/L l'inactivation se produit en 1,5 et 4,5 minutes aux pH 6 et 8 respectivement.

Pour avoir une action aussi efficace que les autres désinfectants, l'ion argent doit être utilisé pendant un temps de contact plus long. Une concentration de 80 µg/L en ion argent entraîne une réduction de 99,999% des *P. aeruginosa* après 6 heures de contact (Huang *et al.*, 2008). L'activité de ces ions ne serait pas inhibée par la présence de matière organique (Silvestry-Rodriguez *et al.*, 2007).

Les *Pseudomonades* ont une grande capacité à survivre ou se multiplier dans les milieux hydriques. Si l'utilisation de désinfectants peut éliminer une partie de ces bactéries, la formation de biofilms leur confère une résistance.

Les résultats des études menées sur les désinfectants sont difficilement généralisables car les données résultent d'essais réalisés sur des espèces et des souches différentes et dans des conditions très disparates. Il est constaté la présence de *Pseudomonades* dans des eaux de piscines pourtant chlorées et les données de la base SISE-Eaux indiquent que les prévalences de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* sont significativement plus faibles dans les eaux de distribution publique lorsque la concentration en chlore libre est supérieure à 0,3 mg/L.

Il semble que l'ozone soit plus efficace que le chlore et que les doses résiduelles de chlore couramment retrouvées dans les réseaux ne permettent pas de lutter contre la contamination liée aux biofilms.

IV. Méthodes d'analyse

Différentes méthodes, proposées dans des travaux scientifiques ou dans le cadre de référentiels normatifs internationaux, peuvent être employées pour dénombrer les *Pseudomonades* dans les milieux hydriques. Ces méthodes reposent sur des principes pouvant être très différents et qui selon leurs utilisations ne fourniront pas la même information. Elles présentent des avantages et des inconvénients qu'il faut absolument prendre en considération en fonction de l'objectif souhaité ainsi que pour l'interprétation des résultats (présence, cultivabilité, infectiosité, etc.). Néanmoins, dans le

domaine de la microbiologie des eaux seule la méthode de référence normalisée NF EN ISO 16266² est exigée au niveau réglementaire et elle est limitée à la recherche de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'annexe D détaille les méthodes d'analyse présentées ci-après.

1. Méthode par culture sur milieu sélectif ou non

À ce jour, les méthodes de détection basées sur l'ensemencement des Pseudomonades sur milieux de culture constituent l'outil de référence pour mettre en évidence la présence de ces bactéries dans un échantillon hydrique. Ces méthodes de détection quantitatives sélectionnent les Pseudomonades cultivables présents dans l'eau. Les résultats sont obtenus après des temps d'incubation variant de 24h à 48h, voire davantage selon les espèces recherchées (10 jours pour les bactéries psychrophiles). De plus, elles ne permettent pas de mettre en évidence les bactéries qui seraient sous une forme viable mais non cultivable (VNC) (Vachee *et al.*, 1997).

Les méthodes par culture comportent généralement les étapes suivantes :

- Concentration par filtration d'un volume d'eau sur une membrane,
- Ensemencement sur milieu nutritif sélectif ou non, liquide ou solide puis incubation,
- Identification des Pseudomonades détectées.

Seule la méthode de référence normalisée NF EN ISO 16266¹ est préconisée au niveau réglementaire pour effectuer la recherche par culture de l'espèce *P. aeruginosa* dans les eaux. Il n'existe pas en revanche de « méthode universelle » de culture permettant la détection de l'ensemble des Pseudomonades suivant un mode opératoire unique. Compte tenu de la grande variété d'espèces appartenant à cette famille et de leurs exigences métaboliques, il est nécessaire de multiplier les conditions opératoires pour pouvoir détecter le plus grand nombre d'espèces.

Différentes méthodes d'identification ont été décrites. Des dispositifs d'identification permettant la lecture simultanée d'un grand nombre de caractères biochimiques liés au métabolisme des bactéries sont commercialisés. Néanmoins ce type de dispositif qui s'appuie sur la mise en évidence d'une vingtaine de caractères, ne permet d'identifier que quelques espèces de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. oryzihabitans*, *P. putida*, et *P. stutzeri*) sur les 150 espèces de *Pseudomonas* actuellement répertoriées. Néanmoins, cette méthode permet également d'identifier des espèces apparentées telles que *B. cepacia*, *B. pseudomallei* ou *S. maltophilia*.

De plus en plus souvent, des techniques moléculaires sont employées pour confirmer l'identification de ces bactéries (Lavenir *et al.*, 2008; Perola *et al.*, 2002).

2. Autres méthodes de détection

Les méthodes d'analyse par biologie moléculaire d'amplification génomique ou d'hybridation génomique sont très peu utilisées pour détecter et quantifier les Pseudomonades dans les échantillons hydriques directement après une étape de concentration. Ces méthodes peuvent également être employées après une étape de multiplication des bactéries sur milieu de culture adapté.

² NF EN ISO 16266 - Août 2008 - Indice de classement : T 90-419 : Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* - Méthode par filtration sur membrane (*anciennement norme NF EN 12780 (2002)

L'avantage de ces méthodes par rapport aux méthodes par culture réside dans leur très grande spécificité et une plus grande rapidité. La détection d'un faible nombre de bactéries dans un échantillon peut être réalisée en moins de 4 heures sans étape de multiplication sur milieu de culture. Elles peuvent, selon les séquences génomiques sélectionnées, détecter soit un grand nombre d'espèces simultanément, soit à l'inverse cibler une seule espèce. Ces méthodes sont capables de détecter des bactéries viables non cultivables, des bactéries mortes, voire des fragments de génome, sans toutefois pouvoir faire la distinction entre ces états. De nombreuses étapes de validation sont encore nécessaires avant que ces méthodes de biologie moléculaire soient utilisables en routine.

D'autres méthodes plus ou moins complexes ont également été décrites pour détecter les *Pseudomonades* dans les eaux tel que, par exemple, la méthode d'impédancemétrie employée après culture sur milieu sélectif décrite par Szita *et al.* 2007 pour détecter les *P. aeruginosa* (Szita *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, les méthodes de détection au niveau de l'espèce évoluent vers des systèmes de détection intégrant les données de phylogénie moléculaire (détection des clones épidémiques).

Seule la quantification par culture de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux est actuellement normalisée. Les autres méthodes de détection sont utilisables dans un contexte de recherche scientifique ou de développement.

V. Présence des *Pseudomonades* dans l'eau de distribution publique

Les résultats d'analyses de *Pseudomonades* issus de la littérature sont présentés ci-après. Ces analyses ont été effectuées à partir d'eau prélevée au niveau du réseau de distribution publique ou au point d'usage. Il est important de noter que ces résultats dépendent très fortement des méthodes d'analyse employées et notamment des températures d'incubation (une incubation à 37° ou 42°C ne permet de dénombrer qu'une infime partie des *Pseudomonades* susceptibles d'être présents).

1. Données internationales

1.1. Réseau de distribution publique

Au Québec, Payment *et al.* (1988), constatent sur les réseaux de distribution de deux communes (de 10 à 31 échantillons selon les sites), des présences très limitées et ponctuelles de *P. aeruginosa* à des teneurs moyennes de 0,06 à 0,12 UFC/L sans qu'une relation soit établie avec le temps de séjour de l'eau au long du réseau.

Ribas *et al.* (2000) ont réalisé une étude de surveillance de 1327 échantillons sur le réseau de distribution d'eau potable de la ville de Barcelone montrant des dénombrements atteignant sur les échantillons positifs une moyenne de 9,7 UFC/100mL. Les pourcentages d'échantillons positifs par zone varient de 1 à 41 %. Les souches isolées identifiées étaient majoritairement des *P. putida* puis des souches de *P. fluorescens* et de *P. aeruginosa*. Le pourcentage d'échantillons positifs pour les *Pseudomonades* est supérieur dans les zones où les valeurs en chlore résiduel étaient inférieures à 0,5 mg/L. Les auteurs suggèrent que le suivi des *Pseudomonades* serait un bon indicateur des zones de croissance bactérienne en réseau de distribution publique.

1.2. Réseau intérieur

En Finlande, Lahti (1993) ne détecte pas la présence de *P. aeruginosa* dans 48 échantillons d'eau du robinet issus de 6 réseaux de distribution différents.

Au Canada, Levesque *et al.* (1994) n'ont jamais détecté *P. aeruginosa* dans les 100 échantillons d'eau du robinet analysés

En Grèce, Papapetropoulou *et al.* (1994) détectent sur 88 échantillons d'eau du robinet 9% de positifs pour la recherche de *P. aeruginosa* et 9% pour d'autres *Pseudomonas* dont *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *S. maltophilia*. La moyenne des dénombrements variait de 7 UFC/100mL (pour *P. aeruginosa*) à 32 UFC/100mL (pour *S. maltophilia*). En revanche, *P. putida* et *P. acidovorans* n'ont pas été détectés.

Aux États Unis, Edberg *et al.* (1996) détectent sur 150 échantillons d'eau du robinet 2% d'échantillons positifs pour *P. aeruginosa* et 5% pour *B. cepacia*. Des concentrations maximales de 16 et 15 UFC/mL ont respectivement été mesurées. En revanche, *P. fluorescens* n'a jamais été détecté.

En Italie, dans la province de Bologne, Zanetti *et al.* (2000) montrent la présence dans 85 échantillons d'eau du robinet de *B. pseudomallei* dans 7% et de *B. cepacia* dans 3,5% des échantillons avec des concentrations moyennes respectives de 578 UFC/100mL (étendue des valeurs : de absence à 15000 UFC/100mL maximum) et <1 UFC/100mL (étendue des valeurs : de absence à 19 UFC/100mL maximum). L'étape d'identification pour cette étude repose sur des analyses phénotypiques or il est aujourd'hui reconnu que ce type d'analyse sur laquelle reposent des dispositifs de diagnostic couramment utilisés en laboratoire peut produire des faux positifs. Kiratisin *et al* (2007) ont montré que la fiabilité de la galerie API 20NE[®] était de l'ordre de 87% pour *B. pseudomallei* et de 93% pour les espèces du Bcc. À notre connaissance, il n'y a pas eu d'autres articles confirmant la présence de *B. pseudomallei* dans les réseaux d'eau italiens ou d'autres pays européens.

En Grande Bretagne, l'analyse de 31 échantillons d'eau du robinet n'a pas montré la présence de *B. cepacia* (Moore *et al.*, 2001).

Aux États-Unis, Chaidez et Gerba (2004) se sont intéressés à l'impact des dispositifs de traitement de l'eau par charbon activé à domicile sur la qualité de l'eau. Ils ont montré que le pourcentage d'échantillons positifs pour *P. aeruginosa* passe de 16,6% pour 30 échantillons d'eau du robinet sans traitement additionnel à 38,5% pour 57 échantillons d'eau du robinet ayant subi un traitement par charbon actif à domicile. Les concentrations maximales quant à elles passent de 320 UFC/500mL sans traitement à 3500 UFC/500mL avec traitement à domicile. Les auteurs suggèrent que ces dispositifs de traitement de l'eau à domicile augmenteraient le nombre de bactéries présentes dans l'eau filtrée en favorisant le développement de biofilms.

Au Brésil, Zamberlan da Silva *et al.* (2008) ont observé que 29% des 96 échantillons d'eaux prélevées au robinet étaient positifs pour le paramètre *P. aeruginosa* et 58 % des 77 eaux en bonbonne de 20 litres analysés. Par ailleurs ces eaux étaient contaminées notamment par des coliformes (3% au robinet et 40% pour les bonbonnes).

Dans un article de synthèse, Mena et Gerba (2009) ont rassemblé les concentrations de *P. aeruginosa* mesurées dans l'EDCH pour une dizaine d'études menées principalement au Canada mais également aux Etats Unis, en Grèce et en Israël. Les fréquences de détection de *P. aeruginosa* dans des eaux du robinet varient de <2 à 24,1% avec des niveaux de concentration variant de 0 à 2300 UFC/mL et de <0,4 et 18,8% dans des eaux embouteillées avec des concentrations variant de 0 à 10 UFC/mL.

Les résultats d'études internationales ne peuvent néanmoins pas être aisément transposés au cas de la France car les filières de potabilisation, la conception et l'entretien des réseaux, la température et les espèces de Pseudomonades retrouvées peuvent fortement varier selon les pays.

2. Données Françaises

2.1. Réseau de distribution publique

A Paris, un contrôle systématique mensuel est effectué sur 50 points du réseau et sur des branchements neufs avant livraison (crèches notamment). 1910 résultats de contrôles effectués sur le réseau entre le 2 janvier 2006 et le 22 octobre 2009 sont disponibles. Seulement 2,3% de résultats sont positifs pour le paramètre *Pseudomonas spp.* avec des dénombrements compris entre 1 et 200 UFC/100mL et, pour les échantillons positifs, une moyenne de 21 UFC/100mL et une médiane de 5 UFC/100 mL. Les recherches sont négatives en situation habituelle et les concentrations les plus élevées correspondent à des analyses effectuées suite à des travaux sur le réseau ayant pu poser des problèmes particuliers (Joyeux, 2010).

2.2. Réseau intérieur

Dès 1975, Labonde et Festy ont recherché *P. aeruginosa* dans les eaux de la ville de Paris. Entre 1975 et 1978, ils ont mis en évidence sur 8 900 échantillons, un taux d'échantillons positifs faible inférieur à 1% avec toutefois des disparités selon les lieux de prélèvement. Si le pourcentage d'échantillons positifs est presque négligeable à l'aval des compteurs des bâtiments (0,3 %), il augmente sensiblement aux points d'usage dans les immeubles abritant des collectivités et dans l'habitat habituellement occupé (0,7 %) et plus nettement dans les structures à ouverture saisonnière telles que les centres aérés où il atteint près de 3 %. Les fréquences d'isolement sont plus élevées l'été pour les différents sites. La présence de *P. aeruginosa* n'est pas associée à celles des indicateurs de contamination fécale mais est reliée à des anomalies concernant les réseaux intérieurs (Labonde et Festy, 1979).

Festy *et al* (1985) montrent la présence de *P. aeruginosa* dans 6 % des 787 échantillons d'eau du robinet lors des contrôles effectués, en 1983, pour la réception sanitaire des immeubles neufs après désinfection et avant mise en service.

Sur la période de 1984 à 1987, Spinasse (1998) dresse le bilan des dégradations observées pour l'eau du robinet à Paris et en Région parisienne. Des situations contrastées apparaissent selon les motifs d'intervention. Les contrôles systématiques (n = 2 055) menés dans l'habitat, les crèches et les écoles montrent un faible pourcentage d'échantillons contaminés par *P. aeruginosa* (0,05%). Au travers des contrôles faisant suite au signalement d'anomalies hydriques par les usagers (n = 553), la présence de *P. aeruginosa* aux points de consommation est peu fréquente (1,1%) et rarement importante. En revanche, les contrôles effectués sur les installations techniquement conformes, rincées et désinfectées des immeubles neufs avant mise en service (n = 1 710) montrent la présence de *P. aeruginosa* dans 2,3 % des échantillons à des concentrations notables (> 100 UFC/100mL).

En 1993 et 1995, les contrôles systématiques de la qualité de l'eau distribuée aux points d'usage de 688 bâtiments recevant des enfants montrent un taux d'échantillons positifs de 2 % pour *P. aeruginosa* (Dubrou, 2010). D'autres espèces ont été identifiées sur le milieu de culture au cétrimide et à l'acide nalidixique incubé à 37°C parmi lesquelles *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. mendocina*, *P. luteola*, *A. hydrophila*, *Achromobacter* et *Alcaligenes* (laboratoire de bactériologie du CRECEP). La présence de *P. aeruginosa* ou de *P. fluorescens* à des concentrations élevées (> 100 UFC/100mL) y est parfois associée à des dénombrements notables de flore aérobie revivifiable à 37°C.

L'exploitation des données de la base SISE-Eaux (annexe C) permet d'obtenir la prévalence, la médiane et le 90^{ème} percentile des concentrations³ mesurées pour *Pseudomonas spp.* et *P.*

³ Les résultats sont exprimés en UFC/100mL que le volume d'eau filtré soit 100mL ou 250mL

aeruginosa dans des échantillons de 100mL et 250mL prélevés au robinet, en France, entre 1996 et 2009. La prévalence de *P. aeruginosa* dans les 2085 échantillons de 100mL analysés est de 3,2%. La médiane des concentrations mesurées est de 8 UFC/100mL et le 90^{ème} percentile est de 200 UFC/100mL pour les échantillons positifs. Une concentration maximale de 2200 UFC/100mL a été mesurée mais il s'agit d'un cas isolé. Pour les 541 échantillons de 250 mL, la prévalence de *P. aeruginosa* n'est pas significativement différente (6,8%), la médiane des concentrations mesurées est de 1,6 UFC/100mL et le 90^{ème} percentile est de 32 UFC/100mL (concentration maximale : 60 UFC/100mL). La prévalence de *Pseudomonas spp.* dans les 1153 échantillons de 100mL d'eau de distribution analysés est de 4,1%. La médiane des concentrations est de 15 UFC/100mL et le 90^{ème} percentile est de 100 UFC/100mL (concentration maximale : 200 UFC/100mL).

L'hôpital constitue un environnement particulier, notamment au regard des patients immunodéprimés qui y séjournent. De nombreuses publications font état de la présence de *Pseudomonas* mais les données varient énormément en fonction du site de prélèvement, de l'ancienneté du réseau et de sa maintenance. Ceci explique qu'une surveillance particulière soit mise en place sur certaines catégories d'eaux (Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005). En fonction des publications les résultats sont variables et montrent parfois des quantifications qui peuvent dépasser plusieurs centaines d'UFC par mL (Adjidé *et al.*, 2010; Lavenir *et al.*, 2008).

Les résultats d'analyses disponibles en France concernent principalement l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Globalement le pourcentage d'échantillons positifs est faible en France (<6%). Selon des données de la base SISE-Eaux, des concentrations quantifiables de *P. aeruginosa* et de *Pseudomonas spp.* sont retrouvées dans environ 4% des échantillons de 100 mL analysés. Le 90^{ème} percentile des concentrations mesurée est de 200 UFC/100mL pour *P. aeruginosa* et 100 UFC/100mL pour *Pseudomonas spp.*

VI. Pathogénicité

1. Virulence et toxicité

La virulence des Pseudomonades a principalement été étudiée chez deux espèces : *P. aeruginosa* et *P. syringae*. Ce dernier étant un phytopathogène, ses propriétés de virulence ne seront pas décrites. De même, *B. pseudomallei* ne sera pas évoqué dans ce rapport car aucun cas autochtone n'a été recensé à ce jour.

En ce qui concerne les *Pseudomonas* d'intérêt clinique hors espèce *P. aeruginosa* tels que *P. putida*, *P. fluorescens*, et *P. stutzeri*, peu d'informations concernant leur virulence sont disponibles. Bien que trouvées responsables de diverses infections, bactériémie ou choc septiques, ces espèces, sont considérées peu virulentes, avec une faible incidence en pathologie humaine.

Les facteurs de virulence décrits à ce jour pour les Bcc et *S. maltophilia* sont également retrouvés chez *P. aeruginosa* excepté le pilus câble pouvant faciliter l'adhésion des Bcc aux cellules épithéliales pulmonaires et une mélanine produite par les Bcc pouvant piéger les radicaux libres de l'oxygène. Parmi les facteurs de virulence décrits pour les Bcc et *S. maltophilia*, aucun ne montre une relation avec une hypothétique colonisation du tractus intestinal. Une publication fait état d'interactions possibles entre les Bcc et les mucines intestinales (Sajjan *et al.*, 1992) mais aucune infection d'origine intestinale par les Bcc n'a été décrite dans la littérature.

Il est important de noter qu'une espèce bactérienne telle que *P. aeruginosa* est formée de nombreux variants génétiques (ou clones) émergents, entre autres, suite à des phénomènes d'éclosion

épidémique donnant naissance à des formes plus fortement transmissibles, virulentes, ou tout simplement plus adaptées au milieu colonisé que ce soit un organe humain ou un écosystème naturel. Les phénomènes liés à ces éclosions épidémiques sont multi-factoriels et impliquent des acquisitions d'ADN, des réarrangements génomiques et la sélection de mutations particulières. Cette plasticité génomique engendre une multitude de génotypes distincts ayant une virulence plus ou moins forte selon la configuration génétique sélectionnée. Il existe donc chez cette espèce des génotypes qui provoqueront des symptômes infectieux plus sévères selon l'organe colonisé. Pour illustrer ce fait, le gène *exoU*, cité ci-dessous, fait partie d'un îlot génomique transmissible au sein de l'espèce mais uniquement retrouvé chez 23% des clones de cette espèce (Pirnay *et al.*, 2009).

Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* peuvent être divisés en deux catégories qui sont décrites ci-dessous en utilisant les facteurs de virulence identifiés lors d'infections du tractus intestinal. D'autres facteurs de virulence référencés à ce jour sont détaillés en annexe E. Les principaux sont représentés dans la figure 1.

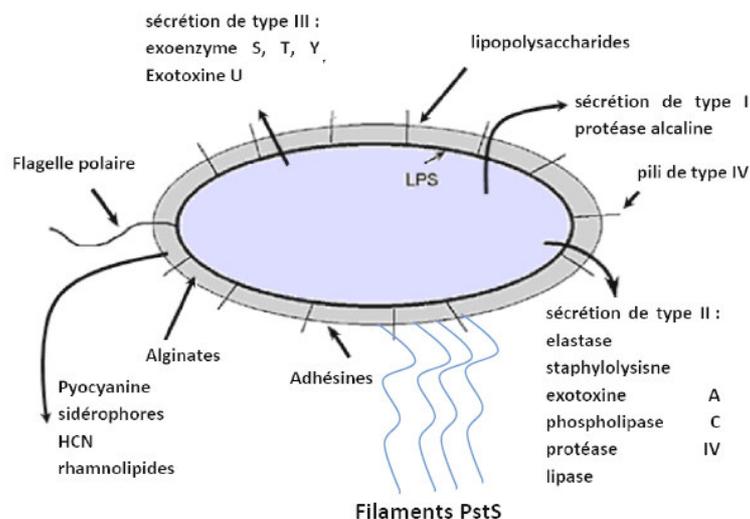


Figure 1 Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* et voies de sécrétion ou d'excrétion. (adapté de Lavenir, 2007).

La première catégorie concerne les facteurs permettant une acclimatation à l'hôte, l'adhérence ou la perturbation des barrières épithéliales. Les facteurs de cette catégorie décrits comme étant impliqués dans certaines infections intestinales sont :

- les filaments PstS qui ont un rôle important dans le contexte des infections intestinales aboutissant à des septicémies (Zaborin *et al.*, 2009). Ils joueraient un rôle dans l'adhérence, déstabiliseraient les cellules épithéliales intestinales en situation de carence en phosphate et induiraient un phénotype hypervirulent (Long *et al.*, 2008; Zaborina *et al.*, 2008).
- la lectine soluble PA-I qui peut favoriser l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales intestinales de souris et l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale face aux exoproduits cytotoxiques tel que l'exotoxine A (Laughlin *et al.*, 2000). Cette lectine est directement cytotoxique pour les cellules épithéliales respiratoires (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994).
- Les LPS (lipopolysaccharides) membranaires qui pourraient favoriser l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales intestinales ou permettre une certaine résistance à des facteurs anti-microbiens de l'hôte (Koh *et al.*, 2005).

La deuxième catégorie concerne les métabolites secondaires, toxines ou enzymes excrétés ou sécrétés et pouvant fragiliser l'hôte ou favoriser la multiplication du micro-organisme. Les facteurs de cette catégorie décrits comme étant impliqués dans certaines infections intestinales sont:

- l'exoenzyme U (enzyme sécrétée directement dans le cytoplasme de la cellule hôte) qui est cytotoxique et possède une activité provoquant le clivage des acides gras membranaires (Phillips *et al.*, 2003). Elle contribue à la sévérité de certaines pneumopathies et semble jouer un rôle dans les infections d'origine intestinale (Koh *et al.*, 2005; Zaborin *et al.*, 2009)
- les rhamnolipides (hémolysines) qui permettent d'inhiber la motilité des cils vibratiles trachéaux et d'augmenter la libération des mucines (Adler *et al.*, 1986).
- l'exotoxine A qui agit sur la synthèse protéique (Iglewski *et al.*, 1977) qui possède des propriétés immunosuppressives et se révèle toxique pour les macrophages.
- une entérotoxine (exotoxine très labile) qui a été peu étudiée mais provoque une accumulation hydrique dans le test de l'intestin ligaturé pour 84% des souches isolées à partir d'animaux domestiques contre moins de 10 % pour les souches hydriques et alimentaires (Baljer et Barrett, 1979). Cette entérotoxine pourrait donc être à l'origine des entérocrites provoquées par certaines souches de *P. aeruginosa*.
- des sidérophores (pyoverdine et pyocheline) permettant la chélation du fer, un élément essentiel pour la croissance des micro-organismes. La pyoverdine jouerait un rôle clé dans la formation d'un complexe quinolone (Xiao *et al.*, 2006), avec les ions Fe^{3+} et des rhamnolipides. Ce complexe induit une forte mortalité chez un modèle murin développé pour l'étude des infections intestinales et provoquerait les symptômes d'une septicémie sévère (Zaborin *et al.*, 2009).

2. Pouvoir épidémiogène

P. aeruginosa est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans la 3^e édition de ses recommandations pour la qualité des eaux de consommation humaine de 2008 (OMS, 2008) comme une bactérie pathogène d'origine hydrique à impact modéré sur la santé, en raison de son faible pouvoir infectieux relativement à d'autres bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Vibrio cholerae*, etc.).

L'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US-EPA) a publié en septembre 2009 sa « Candidate Contaminant List 3 » (CCL3) : liste de 104 contaminants chimiques et 12 contaminants microbiologiques qui pourraient être pris en compte dans une future réglementation pour l'eau potable. Bien que l'environnement soit l'habitat naturel des *Pseudomonas*, ceux-ci n'ont pas été retenus dans cette liste en raison de l'absence de preuve épidémiologique de maladies liées à l'ingestion d'eau potable.

L'INVS, dans son rapport de 2007 sur les infections hydriques, indique que les *Pseudomonas sp.* peuvent infecter les personnes immunodéficientes par ingestion d'eau distribuée. En revanche, les *Pseudomonas* ne sont à rechercher qu'en deuxième intention dans les eaux en cas d'infection (Beaudeau *et al.*, 2007).

La situation relative à *P. aeruginosa* et à d'autres Pseudomonades ayant un pouvoir épidémiogène est plus complexe que pour d'autres bactéries car leur transmission se fait par voie féco-orale mais également par voie cutanéomuqueuse. La rupture de cette barrière est à l'origine d'infections oculaires, d'infections de plaies et d'escarres, de septicémies, d'infections d'organes divers. Les sujets fragilisés sont plus particulièrement sensibles.

2.1. Association bactérie – maladie

Concernant l'association avec les maladies d'origine hydrique, *P. aeruginosa* est l'espèce de Pseudomonades faisant l'objet du plus grand nombre de publications. Cette espèce peut provoquer une assez grande variété d'infections, mais rarement chez des individus sains sans facteur prédisposant. Sont surtout décrites dans la littérature des colonisations de sites cutanés prédisposés telles que brûlures ou plaies chirurgicales (infections de site opératoire), des infections du système respiratoire de personnes souffrant de maladie sous-jacente et des infections oculaires après griffure de la cornée. À partir de ces sites, la bactérie peut passer par voie sanguine et se disséminer dans différents organes. Le contact prolongé avec de l'eau contaminée peut entraîner, chez des personnes saines, des infections oculaires de type kérato-conjonctivite (liquide de nettoyage des lentilles de contact), du système ORL (otites liées à la fréquentation des piscines) et de la peau (folliculites liées aux jets sous pression des spas) (Sarlangue *et al.*, 2006).

Cette bactérie est surtout une cause fréquente d'infection nosocomiale du fait de sa présence possible dans tous les environnements humides (Exner *et al.*, 2005) à partir desquels le matériel ou les mains des soignants peuvent être contaminés. Anaissie *et al.* (2002) et Merlani et Francioli (2003) estiment qu'aux États-Unis la mortalité liée à des épidémies à *P. aeruginosa* dans les hôpitaux serait de 1400 cas par année. La source de l'infection est souvent difficile à identifier : aliments et médicaments contaminés (Shooter *et al.*, 1969), eau du robinet comme source d'une épidémie d'infections du cordon ombilical chez 10 nouveau-nés (Weber *et al.*, 1971). Enfin en Allemagne, l'étude de Eckmanns *et al.* (2008) rapporte une épidémie d'infections à *P. aeruginosa* chez des patients en réanimation liée à de l'eau conditionnée ayant conduit à plusieurs décès. L'emploi d'outils d'analyse de biologie moléculaire a permis de bien montrer que la souche contenue dans ces bouteilles d'eau était responsable de ces cas. Toutefois, les patients exposés présentaient initialement de graves pathologies sous-jacentes et l'eau était utilisée pour ingestion par sonde nasogastrique, préparation de médicaments et réalisation de soins oropharyngés.

Chaidez *et al.* en 1999 aux États-Unis soulignent que, bien que 23% des échantillons d'eau de fontaines à eau qu'ils ont analysés aient été contaminés par *P. aeruginosa*, aucune épidémie reliée à ces fontaines n'a été documentée (Chaidez et Gerba, 2004).

Il n'existe aucune preuve que l'usage normal d'eau de boisson contaminée par *P. aeruginosa* puisse être source d'infection dans la population générale par voie orale. Les cas rapportés sont liés à des populations sensibles et des usages particuliers dans des établissements de santé.

Le travail de Koh *et al.* (2005) a permis de tester sur un modèle murin les facteurs permettant à *P. aeruginosa* de coloniser le tube digestif et de disséminer par translocation dans le courant circulatoire sanguin sur un terrain neutropénique. Dans ce modèle les souris reçoivent une administration préliminaire d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) puis ingèrent de l'eau contaminée par différentes souches mutantes ou non de *P. aeruginosa* (10^7 UFC/L) pendant 5 jours. Une neutrogénie est ensuite induite chez les souris (cyclophosphamide ou anticorps monoclonal). Dans ces conditions les lipopolysaccharides de la membrane externe sont nécessaires pour établir la colonisation (Koh *et al.*, 2005). Il a déjà été montré une forte variation génétique influençant la virulence (annexe E).

Ainsi il apparaît que les caractéristiques métaboliques des souches de *P. aeruginosa* sont importantes pour le pouvoir épidémiogène sur un terrain neutrogénique.

D'autres espèces de Pseudomonades ou plus spécifiquement certaines souches de ces espèces, sont décrites dans la littérature scientifique comme des pathogènes opportunistes. La plupart d'entre elles ont été isolées dans des prélèvements humains sur malades et leurs facteurs de virulence mis en évidence, mais sans que le lien direct avec la pathologie ait été établi. Il s'agit notamment de : *P. alcaligenes*, *P. balearica*, *P. fluorescens*, *P. lutolea*, *P. mendocina*, *P. mosselii*, *P. oryzihabitans*, *P. otitidis*, *P. pertucinogena*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. pseudalcaligenes*, *Brevundimonas vesicularis*, *S. paucimobilis*, *S. maltophilia* et de Bcc.

Ainsi, *P. fluorescens* a été décrit dans des infections pulmonaires (Redding et McWalter, 1980), *P. luteola* dans des infections oculaires, digestives et cutanées (D'alameda *et al.*, 2004), *P. otitidis* dans

des otites (Clark *et al.*, 2006) alors que *S. maltophilia* et *B. cepacia* peuvent entraîner des infections respiratoires lourdes après exposition par voie respiratoire (Looney *et al.*, 2009). Aucune infection d'origine intestinale n'a été décrite dans la littérature pour les Bcc.

En ce qui concerne *S. maltophilia*, une publication fait état d'une forte prévalence de cette bactérie chez des patients d'une unité d'oncologie affectée par des diarrhées mais les facteurs de virulence impliqués ne sont pas décrits (Apisarnthanarak *et al.*, 2003).

Sur 20 épidémies recensées aux États-Unis entre 2005 et 2006 et clairement liées à la consommation d'eau du robinet, aucune n'a incriminé la présence de Pseudomonades (Yoder *et al.*, 2008).

2.2. Facteurs prédisposants

L'immunodéficience est un facteur prédisposant aux infections par les Pseudomonades. Ainsi, *P. putida*, *P. stutzeri*, les Bcc, *S. paucimobilis* et *S. maltophilia* sont des pathogènes opportunistes retrouvés chez les patients immunodéprimés (Dignani *et al.*, 2003; Mahenthiralingam *et al.*, 2008; Maragakis *et al.*, 2009; Noble et Overman, 1994). Nombreuses sont les publications relatives aux infections à Pseudomonades chez des patients atteints de cancer et d'agranulocytose (Khardori *et al.*, 1990; Mena et Gerba, 2009; Rolston et Bodey, 1992; Schimpff *et al.*, 1973) ou de mucoviscidose, pour lesquels la cause de la mort est souvent une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* ou *B. cepacia* (Mouterde *et al.*, 1995). Les publications s'intéressant aux infections à Pseudomonades chez des patients atteints de SIDA sont plus rares (Witt *et al.*, 1987). Plus récemment, *P. aeruginosa* a été reconnu comme souvent associé à des pathologies digestives chroniques : Maladie de Crohn (Wagner *et al.*, 2008), ce qui avait déjà été évoqué par Horing *et al.* (1991).

Le risque élevé d'infection à *P. aeruginosa* dans les hôpitaux a conduit certains pays, notamment la France, l'Allemagne et la Grande-Bretagne, à proposer une valeur paramétrique (absence /100mL) pour certaines catégories d'eaux destinées aux soins dans les secteurs d'immunodéprimés (Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005) et la mise en œuvre de stratégies de réduction du risque par filtration terminale en particulier (Cervia *et al.*, 2007; Freije, 2005; Simon *et al.*, 2008).

Dans le contexte d'une exposition par voie orale, seule l'espèce *P. aeruginosa* semble pouvoir être suspectée d'avoir entraîné des conséquences cliniques, tandis que *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia* peuvent avoir des conséquences respiratoires lourdes après exposition par voie respiratoire. Ces pathologies surviennent principalement chez des individus présentant des facteurs prédisposants (immunodéficience).

L'état actuel des connaissances ne permet pas de suspecter une pathogénicité d'autres espèces de Pseudomonades ingérées par voie orale.

3. Relation dose-réponse

Les études utilisées pour analyser les relations doses-réponse font usage de génotypes particuliers qui peuvent affecter les relations dose-réponse décrites.

3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

La prévalence de colonisation chez les adultes en dehors de l'hôpital est faible (2,6-24%) (Rusin *et al.*, 1997) mais elle augmente lors d'une prescription médicamenteuse (antibiotiques notamment). Ceci a été démontré expérimentalement sur modèle souris où les cinq antibiotiques testés ont diminué la

résistance à la colonisation d'environ 50% après ingestion de 10^8 *P. aeruginosa*, la streptomycine étant l'antibiotique semblant entraîner la colonisation la plus importante (Hentges *et al.*, 1985). Avec le même modèle, après sensibilisation par ingestion d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline) et administration de 10^7 bactéries/mL d'eau pendant 5 jours, la dissémination dans les organes est très largement augmentée par l'administration de cytostatiques (ex cyclophosphamide) comme cela doit se produire durant le traitement du patient cancéreux (Koh *et al.*, 2005).

Selon George *et al.*, (1989), *P. aeruginosa* n'entraîne pas de colonisation digestive et n'est pas retrouvé en quantité importante dans les selles 14 jours après le gavage de souris pendant 60 jours avec 10^9 UFC de *P. aeruginosa*. Par voie intra-nasale George *et al.*, (1991) montrent également que la dose infectante est élevée puisqu'avec $1,6.10^3$ UFC/animal la souche est éliminée et que $1,6.10^7$ UFC/animal sont nécessaires pour que *P. aeruginosa* soit retrouvé dans le tube digestif. La Dose Létale 50% (DL 50) est de $2,7.10^7$ UFC par cette voie et la mortalité de la souris est certaine dans les 24-36 heures après inoculation de $2,2.10^9$ UFC. Ces essais ont été confirmés par Pier *et al.* (1992).

Au cours d'un travail relativement ancien (Buck et Cooke, 1969), trois volontaires sains ont ingéré différentes souches de *P. aeruginosa*, d'origines diverses (environnementale, fécale, alimentaire et respiratoire) et dans des quantités variant de 5.10^2 à 2.10^8 UFC par administration. Il n'a jamais été observé de signes cliniques et il a fallu des ingestions de plus de 10^6 bactéries pour que la souche ingérée soit retrouvée dans les selles. Cette ingestion n'a jamais donné lieu à colonisation, la souche passant en simple transit dans les selles. Seule l'administration concomitante d'antibiotiques a entraîné pour l'un des volontaires la colonisation du tractus intestinal.

Mena et Gerba (2009) estiment, à partir d'une revue de la littérature que, par voie orale, la dose médiane infectante est de l'ordre de 10^{10} UFC chez l'Homme sain et 10^7 UFC chez l'Homme soumis à un traitement par ampicilline, tandis qu'elle est de l'ordre de 10^8 UFC chez la souris et de 10^4 à 10^8 UFC chez la souris soumise à antibiothérapie, selon la nature de l'antibiotique.

3.2. Autres espèces

Selon George *et al.* (1989), un gavage de souris CD1 pendant 60 jours avec 10^9 UFC de *S. maltophilia* n'entraîne pas de morbidité excepté une importante prise de poids sans que l'examen autopsique pratiqué 14 jours plus tard ne montre une colonisation du système digestif

De telles études n'ont pas été trouvées dans la littérature pour d'autres *Pseudomonas*.

À partir des données disponibles, une relation dose-réponse par ingestion ne peut être établie que pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

La relation dose-réponse est fonction du génotype de la souche concernée, du terrain de la personne et des thérapeutiques qu'elle peut éventuellement recevoir. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, la dose médiane infectante (dose entraînant une colonisation transitoire du tube digestif sans signe clinique) par voie orale serait de l'ordre de 10^{10} UFC chez l'Homme sain et 10^7 UFC chez l'Homme soumis à un traitement par ampicilline.

Aucune étude relative aux enfants ou aux nourrissons n'a été trouvée.

4. Résistance aux antibiotiques

Les *Pseudomonades* possèdent des mécanismes de résistance naturelle et acquise.

4.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (β -lactamines notamment) est élevée. Elle est liée à la production d'une céphalosporinase. Cette bactérie présente de plus des pompes d'efflux physiologiques pouvant être surexprimées ou de porines physiologiques pouvant être modifiées qualitativement ou quantitativement.

La résistance naturelle des bactéries du Bcc est supérieure à celle de *P. aeruginosa*, notamment en ce qui concerne les β -lactamines. Elle fait intervenir des phénomènes d'imperméabilité et d'efflux ainsi que l'action de deux β -lactamases inductibles (Poirel *et al.*, 2009). Une résistance de bas niveau à l'imipénème est également décrite (Baxter et Lambert, 1994) ainsi qu'une résistance naturelle aux familles des aminosides et polymyxines (Philippon, 2006).

S. maltophilia est également naturellement plus résistant aux antibiotiques que *P. aeruginosa* et son profil de multirésistance caractéristique constitue une aide à l'identification de cette bactérie. La publication récente des séquences totales de 2 génomes de *S. maltophilia* a confirmé que cette bactérie contient un large répertoire de déterminants de la résistance aux antibiotiques (Crossman *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci, de nombreuses pompes d'efflux, β -lactamases et enzymes inactivant les aminosides ont été retrouvées. L'existence d'un gène à l'origine d'une perte de sensibilité aux quinolones et fluoroquinolones a également été rapportée (Shimizu *et al.*, 2008).

4.2. Résistance acquise

L'acquisition de résistance est particulièrement rapide lors des monothérapies pour traiter les infections à *P. aeruginosa* (Nordmann, 2006). De nombreux mécanismes de résistance acquise touchant toutes les familles d'antibiotiques peuvent s'additionner et conduire à la multi-, voire à la toto-résistance (résistance à l'ensemble des familles connues d'antibiotiques). La fréquence d'isolement de ce type de souches est en augmentation dans le monde ces dernières années (Livermore, 2002; Rossolini et Mantengoli, 2005). Il existe une variété des supports génétiques de la résistance (plasmides, transposons, intégrons) et un nombre croissant de β -lactamases transmissibles dont les β -lactamases à spectre étroit (les plus fréquentes en France) et les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) a été décrit. La répartition des β -lactamases reste hétérogène dans le monde et, si elles sont encore rares en France, elles sont néanmoins pour la plupart impliquées dans des épidémies nosocomiales. Elles sont considérées actuellement comme les plus menaçantes car elles ont rapidement émergé et largement diffusé jusqu'à être pandémiques (Picao *et al.*, 2009). Il existe également des enzymes de résistance aux aminosides.

Pour les bactéries du Bcc, l'acquisition de résistances aux β -lactamines, aux aminosides et aux sulfamides a été démontrée par la présence d'intégrons dans le génome de certaines souches. Des résistances acquises sont également décrites pour le chloramphénicol et le triméthoprime par diminution de la perméabilité membranaire et de l'affinité pour la cible (Philippon, 2006). Enfin, des mutants résistants aux fluoroquinolones ont été obtenus *in vitro* (Pope *et al.*, 2008). L'ensemble de ces observations suggère que le niveau naturel de résistance du complexe cepacia peut encore croître sous l'effet de ces divers mécanismes.

Pour *S. maltophilia*, la résistance acquise est majoritairement due à des mutations dans les gènes codant les éléments responsables de la multirésistance naturelle (hyperproduction des β -lactamases naturelles, perméabilité et/ou efflux modifiés) (Looney *et al.*, 2009). La résistance acquise par transfert horizontal de nouveaux gènes de résistance semble, quant à elle, beaucoup plus rarement impliquée. Des études suggèrent que cette espèce pourrait également constituer un réservoir de gènes de résistance diffusibles, notamment dans l'environnement (Al Naiemi *et al.*, 2006; Lavigne *et al.*, 2008).

Enfin, la capacité démontrée des *Pseudomonades* à former des biofilms pourrait rendre compte d'une augmentation supplémentaire de la résistance de ces bactéries aux antibiotiques (Caraher *et al.* 2006; Crossman *et al.*, 2008; Liaw *et al.*, 2010).

Les *Pseudomonades* présentent naturellement une forte résistance aux antibiotiques et montrent une capacité d'adaptation élevée face à ces molécules. Cela se traduit par des mutations ou l'acquisition d'éléments génétiques exogènes.

VII. Évaluation des risques sanitaires liés à l'ingestion de *Pseudomonades* *via* l'eau de distribution publique

1. Identification des dangers

Comme présenté dans le chapitre précédent, peu d'espèces de *Pseudomonades* ont été responsables de pathologies digestives. Ces phénomènes infectieux individuels ou épidémiologiques ont le plus souvent été rencontrés chez des personnes immunodéprimées, en particulier en milieu de soins.

P. aeruginosa est un micro-organisme retrouvé dans les milieux hydriques qui est doté d'une capacité d'adaptation remarquable à des conditions très variables. L'Homme l'ingère quotidiennement, parfois en grande quantité avec les aliments crus et l'eau de boisson. Il ne semble pas attaquer les tissus normaux mais, comme tout pathogène opportuniste, peut entraîner des infections graves chez des patients fortement immunodéprimés, peu nombreux et bien identifiés (Hardalo et Edberg, 1997). Selon les mêmes auteurs les patients qui souffrent d'une immunodéficiences modeste (maladie de système immunitaire telle que le Lupus ou phase post hospitalisation de traitement de cancer) ne sont pas plus sensibles à *P. aeruginosa* que le reste de la population.

Les autres espèces de *Pseudomonades* sont *a priori* encore moins pathogènes et n'exercent pour certaines leur pouvoir infectieux que sur des patients fortement immunodéprimés (*P. putida*, *P. stutzeri*). Il en est de même pour les Bcc, *S. paucimobilis* et *S. maltophilia*.

2. Évaluation de l'exposition

Lorsque *P. aeruginosa* ou d'autres espèces apparentées sont présents dans l'EDP, ils le sont à des concentrations faibles. Ainsi, des concentrations en *P. aeruginosa* supérieures à 10 UFC/100mL sont rares et celles supérieures à 100 UFC/100mL exceptionnelles. En France, selon les données de la base SISE-Eaux, pour *P. aeruginosa*, la médiane des concentrations mesurées est de 8 UFC/100mL et le 90^{ème} percentile correspond à 200 UFC/100mL. Une valeur maximale de l'ordre de 2200 UFC/100mL a été mesurée mais il s'agit d'un cas isolé. Pour *Pseudomonas spp.* la médiane des concentrations est de 15 UFC/100mL et le 90^{ème} percentile est de 100 UFC/100mL (concentration maximale : 200 UFC/100mL).

Pour évaluer l'exposition de l'Homme *via* l'EDP, la concentration mesurée doit être rapportée au volume d'eau consommé par jour. Trois types de populations doivent être pris en compte pour le calcul de l'exposition: les adultes, les enfants et les nourrissons. Pour ces trois populations, la consommation d'eau du réseau public de distribution définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est indiquée dans le tableau II.

Ces valeurs sont plutôt conservatrices puisque, selon l'enquête INCA 1999 (enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires) réalisée auprès de 3003 sujets représentatifs de la population française, la consommation moyenne d'eaux est d'environ 600 mL par jour pour un adulte de 60 kg. Seuls les gros consommateurs (percentile 99) ont une consommation de l'ordre de deux litres (Afssa, 2003).

Tableau II : Valeurs de consommation d'eau du réseau de distribution proposées par défaut par l'OMS pour différentes classes d'âge par unité de poids corporel (OMS, 2004)

Population	Valeurs par défaut proposées par l'OMS
Adultes (≥15 ans)	33,3 mL/kg pc/j (2 L/60 kg/j)
Enfants (de 3 à 14 ans)	100 mL/kg pc/j (1 L/10 kg/j)
Nourrissons (de 1 à 30 mois)	150 mL/kg pc/j (0,75 L/5 kg/j)

Ainsi, pour une consommation de 2L d'eau par jour, l'exposition journalière à *P. aeruginosa* par l'EDP, lorsqu'elle existe, excède rarement 200 à 4000 UFC/jour (90^{ème} percentile) pour un adulte de 60 kg, 100 à 2000 UFC/jour pour un enfant de 10 kg et 75 à 1500 UFC/jour pour un nourrisson de 5 kg. Ces chiffres doivent être comparés aux concentrations pouvant atteindre 10⁷ UFC/g dans les aliments (Dejli *et al.*, 2000 ; Soriano *et al.*, 2000 ; Curran *et al.*, 2005 ; Correa *et al.*, 1991 ; Gennari et Dragotto, 1992). Selon le régime alimentaire, la nature et la provenance des aliments, l'exposition par cette voie peut être très largement supérieure à l'exposition *via* l'EDP. De plus, il convient de rappeler que *P. aeruginosa* absorbé avec de l'eau est soumis à l'action délétère du pH gastrique acide sans l'effet protecteur que confère la matrice alimentaire.

L'eau du robinet étant utilisée à d'autres fins que la boisson, des expositions par voie cutanée (hygiène corporelle), voire respiratoire (douche) pourraient être envisagées mais ne font pas l'objet de ce rapport. Ces expositions ne doivent cependant pas être négligées, en particulier pour des patients immunodéprimés, atteints de mucoviscidose ou porteurs de plaies et d'autres effractions cutanéomuqueuses.

3. Relation dose-réponse

Les études citées précédemment ont montré sur modèle murin (George *et al.*, 1989) que 14 jours après un gavage avec 10⁹ UFC, *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* ne sont pas retrouvés en quantité importante dans les selles et n'ont pas entraîné de colonisation digestive. Pour observer des pathologies, il faut exposer les animaux à *P.aeruginosa* par voie nasale pour laquelle la DL50 est de 2,7 x 10⁷ UFC (George *et al.*, 1991).

À des doses d'exposition par voie orale plus faible, il faut administrer des antibiotiques à la souris pour observer une colonisation digestive.

Chez l'Homme la seule expérimentation sur volontaires sains a montré également que la prise d'antibiotique (ampicilline) augmentait la durée d'excrétion fécale en *P. aeruginosa* et qu'aucun des volontaires n'avait présenté de symptômes pour des doses de 10⁶ à 10⁸ UFC (Buck et Cooke, 1969).

En s'appuyant sur ces résultats, Rusin *et al.* (1997) utilisent un modèle exponentiel pour définir des relations dose-effet en cas de prise concomitante ou non, d'antibiotiques. Selon ces auteurs, la dose médiane infectante serait de l'ordre de 10^{10} UFC chez l'Homme sain et 10^7 UFC chez l'Homme soumis à un traitement antibiotique de 4 jours par ampicilline. Elle est probablement plus faible chez le patient immunodéprimé profond sans qu'une valeur puisse être fixée.

La relation dose-réponse est donc fonction du terrain de la personne et des thérapeutiques qu'elle peut éventuellement recevoir mais également du génotype de la souche étudiée.

Aucune donnée n'est disponible pour les autres espèces.

4. Caractérisation du risque

En soulignant la faiblesse des données expérimentales précédemment exposées, il s'avère cependant possible de calculer une probabilité de colonisation transitoire du tube digestif par *P. aeruginosa* en fonction de la concentration rencontrée dans l'eau et du terrain de la personne exposée. S'appuyant sur les résultats des travaux de Buck et Cook (1969), Rusin *et al.* (1997) proposent d'utiliser un modèle exponentiel pour approcher ce risque :

$$P_i = 1 - e^{-(1/k) \times N}$$

Avec : P_i : probabilité d'infection

1/k : probabilité de survie du germe ingéré dans l'hôte

N : nombre de micro-organismes ingérés

Le risque journalier de colonisation a été calculé pour des sujets sains et des sujets sains traités par ampicilline. Les auteurs ont utilisé les concentrations minimales et maximales mesurées dans l'eau et ont considéré une consommation de 2 litres d'eau par jour.

Dans ces conditions, le risque journalier de colonisation lors d'une exposition isolée est évalué comme présenté dans le tableau III.

Tableau III : Risque journalier de colonisation lors d'une exposition isolée à *P. aeruginosa* (Rusin *et al.*, 1997)

	Dose d'exposition à <i>P. aeruginosa</i> pour 2 L d'eau ingérés par jour (UFC/2 L)	Risque journalier de colonisation lors d'une exposition isolée
Adulte sain	20	$1,7 \times 10^{-8}$
	$4,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^{-3}$
Adulte sain sous antibiothérapie par ampicilline	20	$4,1 \times 10^{-7}$
	$4,6 \times 10^6$	$9,0 \times 10^{-2}$

Par extension, en retenant les mêmes hypothèses de calcul et en tenant compte de deux niveaux de consommation⁴, le risque de colonisation par voie orale lié à une contamination exprimée en UFC/100mL dans l'eau de boisson est détaillé dans le tableau IV.

⁴ Les chiffres d'enquêtes de consommation (Inca) montrent que la consommation moyenne d'eau non chauffée est de l'ordre de 600 mL/j et celle des plus gros consommateurs (percentile 99) d'environ 2 L/j

Tableau IV : Estimation du risque de colonisation par *P. aeruginosa* en fonction de la concentration dans l'eau et du volume d'eau consommé par jour pour un adulte (population générale).

Concentration	Risque de colonisation par <i>P. aeruginosa</i> pour un adulte (population générale)	
	Consommation moyenne (600 mL/j)	Consommation maximale (2L/j)
0,1 UFC/100mL	5.10^{-10}	$1,7.10^{-9}$
0,5 UFC/100mL	$2,5.10^{-9}$	$8,4.10^{-9}$
8 UFC/100mL*	4.10^{-8}	$1,3.10^{-7}$
25 UFC/100mL	$1,3.10^{-7}$	$4,2.10^{-7}$
100 UFC/100mL	5.10^{-7}	$1,7.10^{-6}$
200 UFC/100mL**	1.10^{-6}	$3,4.10^{-6}$
2200 UFC/100mL***	1.10^{-5}	$3,7.10^{-5}$

* : médiane des concentrations de la base SISE-Eaux

** : 90^{ème} percentile des concentrations de la base SISE-Eaux

*** : concentration maximale de la base SISE-Eaux

Si on considère un risque acceptable de 1 cas de colonisation pour 10000 personnes exposées (10^{-4}), celui ci serait atteint avec une eau contenant 6000 UFC/100mL pour une consommation de 2 L/j ou 20 000 UFC/100mL pour une consommation de 600 mL/j. Ces concentrations sont très supérieures à la concentration maximale de 2200 UFC/100mL retrouvée dans les données de la base SISE-Eaux (annexe C).

De la même façon, lors d'une antibiothérapie par ampicilline, le risque de 10^{-4} de colonisation transitoire du tube digestif serait atteint avec une eau contenant 250 UFC/100mL pour une consommation de 2 L/j ou 820 UFC/100mL pour une consommation de 600 mL/j, ce qui est supérieur à la valeur du 90^{ème} percentile des concentrations retrouvées dans les analyses de la base SISE-Eaux (annexe C).

Aucune donnée ne permet de calculer un risque de maladie dans la mesure où aucun signe clinique n'a été observé expérimentalement malgré des niveaux d'exposition très élevés.

En cas d'immunodépression ou de cumul de facteurs de risque (antibiothérapie et immunodépression), le risque ne peut être estimé. Néanmoins, des éléments suggèrent qu'il existe et que dans ces cas particuliers de cumul de facteurs de risques, il peut être élevé.

Cependant, par voie orale pour la population générale, le risque de pathologie liée à *P. aeruginosa* apparaît très faible pour les concentrations classiquement retrouvées dans l'eau de boisson en France et, pour les personnes ne présentant pas de facteurs de sensibilité particuliers, probablement inférieur à 10^{-10} .

Le manque de données pour les autres espèces de Pseudomonades ne permet pas de procéder à une évaluation des risques pour les Pseudomonades dans leur globalité.

Faute de données dans la littérature, il n'apparaît pas possible d'évaluer le risque pour les enfants.

VIII. Synthèse et recommandations

Il existe une grande variété d'espèces parmi les Pseudomonades (actuellement environ 150 espèces pour le seul genre *Pseudomonas*) et des variations génétiques au sein de chaque espèce pouvant conduire à une exposition à des facteurs de virulence spécifiques dont certains peuvent avoir un rôle dans la colonisation du tractus intestinal.

Les Pseudomonades sont naturellement présents dans l'environnement et peuvent être retrouvés en portage sain chez l'Homme.

Actuellement, seul *P. aeruginosa* fait l'objet d'une méthode d'analyse normalisée dans les eaux. Les conditions de dénombrement et d'identification étant en évolution constante, il est difficile de comparer les études menées dans des conditions expérimentales différentes et donc d'avoir une image précise et représentative de la présence de ces micro-organismes dans les aliments et les eaux et donc des doses ingérées par l'Homme.

Des concentrations parfois non négligeables ont néanmoins été observées dans différentes denrées d'origine animale et végétale. Ainsi, la littérature rapporte des concentrations dans les aliments de l'ordre de 10 à 10^6 UFC/g. Malgré ces concentrations potentiellement élevées, aucune toxi-infection alimentaire liée à un ou des Pseudomonades n'a été déclarée à ce jour en France.

La présence de Pseudomonades dont *P. aeruginosa* dans l'eau de distribution publique est liée à leur tropisme naturel pour les milieux hydriques mais aussi à la colonisation de réseaux privés en cas de configuration favorisant la stagnation prolongée de l'eau. La base SISE-Eaux rapporte une prévalence de 3,2% pour *P. aeruginosa* dans les 2085 échantillons de 100mL d'eau du robinet analysés. Pour les échantillons positifs, la médiane des concentrations mesurées est de 8 UFC/100mL et le maximum est de 2200 UFC/100mL (cas isolé). Pour *Pseudomonas spp.*, la prévalence dans les 1153 échantillons de 100mL d'eau de distribution analysés est de 4,1%, la médiane des concentrations est de 15 UFC/100mL et le maximum est de 200 UFC/100mL.

Selon les données disponibles, seule l'espèce *P. aeruginosa* a entraîné des conséquences cliniques dans le contexte d'une exposition hydrique par voie orale, en France métropolitaine. Néanmoins, les cas rapportés sont liés à des populations sensibles et des usages particuliers (sondes nasogastriques notamment) dans des établissements de santé. Il n'existe aucune preuve que l'usage normal d'eau de boisson contaminée par *P. aeruginosa* puisse être source d'infection dans la population générale par voie orale. *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia* peuvent, quant à eux, avoir des conséquences respiratoires lourdes après exposition par voie respiratoire. Ces pathologies surviennent principalement chez des individus présentant des facteurs prédisposants (immunodéficience). L'état actuel des connaissances ne permet pas de suspecter une pathogénicité d'autres espèces de Pseudomonades ingérées par voie orale.

La seule expérimentation chez l'Homme a été faite lors d'un travail relativement ancien (Buck et Cooke, 1969) au cours duquel trois volontaires sains ont ingéré différentes souches de *P. aeruginosa*, dans des quantités variant de 5.10^2 à 2.10^8 UFC par administration. Il n'a jamais été observé de signes cliniques et il a fallu des ingestions de plus de 10^6 bactéries pour que la souche ingérée soit retrouvée dans les selles. S'appuyant sur les résultats de ces travaux, Rusin *et al.* (1997) proposent d'utiliser un modèle exponentiel pour approcher le risque journalier de colonisation transitoire du tube digestif par *P. aeruginosa* pour des sujets sains et des sujets sains traités par ampicilline.

En soulignant la faiblesse des données expérimentales, le groupe de travail a utilisé les mêmes hypothèses de calcul pour évaluer ce risque de colonisation en tenant compte de deux niveaux de consommation d'eau (600 mL/j et 2 L/j). Pour la population générale et pour *P. aeruginosa* l'évaluation ne montre qu'un très faible risque de colonisation transitoire du tube digestif même pour la concentration maximale rencontrée dans l'eau de distribution publique. Certaines populations peuvent, en revanche, être plus sensibles du fait d'une immunité déficiente ou de la prise d'antibiotiques. Néanmoins, un risque de 10^{-4} de colonisation transitoire du tube digestif ne se

rencontrerait que pour des concentrations de *P. aeruginosa* supérieures au 90^{ème} percentile (200 UFC/100mL) des concentrations renseignées dans la base SISE-Eaux.

Sur la base des données disponibles, seule une probabilité de colonisation transitoire du tube digestif par *P. aeruginosa* a donc pu être évaluée. Aucune donnée ne permet de calculer un risque de maladie dans la mesure où aucun signe clinique n'a été observé expérimentalement malgré des niveaux d'exposition très élevés.

Le risque n'a pas pu être évalué pour les personnes immunodéficientes, néanmoins, il est probablement majoré dans ce cas.

Aucune donnée ne permet de calculer un risque pour les autres espèces de Pseudomonades.

En conclusion, sur la base des données disponibles, le groupe de travail considère qu'il n'est pas utile d'introduire une valeur paramétrique pour *P. aeruginosa* dans l'eau de distribution publique, eu égard aux faibles risques estimés pour la population générale, même si, ce paramètre constitue un marqueur de la qualité générale de l'entretien du réseau et de sa contamination par des activités humaines.

Les données disponibles sont trop parcellaires pour que le groupe de travail puisse étayer son évaluation concernant les risques associés:

- à la présence de *P. aeruginosa* dans les eaux de consommation vis-à-vis des populations potentiellement sensibles (nourrissons, personnes immunodéprimées...),
- aux Pseudomonades autres que *P. aeruginosa*,

Pour évaluer ces risques, la mise en place d'études serait nécessaire.

Afin de caractériser plus précisément l'exposition à ces bactéries, le groupe de travail recommande par ailleurs :

- le développement préalable de méthodes normalisées de recherche et de dénombrement des Pseudomonades autres que *P. aeruginosa*.
- la mise en œuvre d'un plan de surveillance permettant d'obtenir des résultats représentatifs de la contamination des eaux de distribution publique au niveau national,
- l'étude de l'impact, sur la prolifération des Pseudomonades dans les réseaux d'eau privés, de l'entretien défaillant des traitements à domicile contenant des supports de filtration, du charbon actif ou des résines.

L'Anses reprend à son compte les recommandations et conclusions issues de l'expertise collective menée au sein du groupe de travail dédié et validées par le comité d'experts spécialisé « Eaux ».

Tels sont les éléments d'analyse que l'Agence est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la Direction générale de la santé concernant l'évaluation des risques sanitaires liés aux *Pseudomonas* présents dans les eaux destinées à la consommation humaine, hors eaux conditionnées.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

Références bibliographiques

Achouak W, Sutra L, Heulin T, Meyer JM, Fromin N, Degraeve S, Christen R, Gardan L (2000) *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**(1), 9-18.

Adjidé CC, De Meyer A, *et al.* (2010) Évaluation des risques microbiologiques hydriques associés à *Stenotrophomonas maltophilia* et *Pseudomonas aeruginosa* au CHU d'Amiens. *Pathologie Biologie*.

Adler KB, Hendley DD, Davis GS (1986) Bacteria associated with obstructive pulmonary disease elaborate extracellular products that stimulate mucin secretion by explants of guinea pig airways. *American Journal of Pathology* **125**, 501-514.

Afssa (2003) Note technique OCA/NB/2003-693 Données de consommation d'eau du robinet dans la population française. Observatoire des consommations alimentaires.

Ait Tayeb L, Ageron E, Grimont F, Grimont PAD (2005) Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology* **156**, 763-773.

Al Naiemi N, Duim B, Bart A (2006) A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* [2]. *Journal of Medical Microbiology* **55**, 1607-1608.

Anaissie EJ, Penzak SR, Dignani MC (2002) The hospital water supply as a source of nosocomial infections: A plea for action. *Archives of Internal Medicine* **162**, 1483-1492.

Andersen SM, Johnsen K, Sorensen J, Nielsen P, Jacobsen CS (2000) *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(6), 1957-1964.

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1563-1589.

Anzai Y, Kudo Y, Oyaizu H (1997) The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavirmonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(2), 249-251.

Apisarnthanarak A, Fraser VJ, Michael Dunne W, Little JR, Hoppe-Bauer J, Mayfield JL, Polish LB (2003) *Stenotrophomonas maltophilia* Intestinal Colonization in Hospitalized Oncology Patients with Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* **37**, 1131-1135.

Arahal D, Castillo A, Ludwig W, Schleifer K, Ventosa A (2002) Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the Family Halomonadaceae, to include the species *Halomonas marina*. *Systematic and Applied Microbiology* **25**(2), 207-211.

Arana I, Muela A, Iriberrí J, Egea L, 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.

Aspinall ST, Graham R (1989) Two sources of contamination of a hydrotherapy pool by environmental organisms. *Journal of Hospital Infection* **14**, 285-292.

Auling G, Reh M, Lee CM, Schlegel HG (1978) *Pseudomonas pseudoflava*, a new species of hydrogen-oxidizing bacteria: its differentiation from *Pseudomonas flava* and other yellow-pigmented, gram-negative, hydrogen-oxidizing species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**(1), 82-95.

Austin B, Goodfellow M (1979) *Pseudomonas mesophilica*, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces. *International Journal of Systematic Bacteriology* **29**(4), 373-378.

Azegami K, Nishiyama K, Watanabe Y, Kadota I, Ohuchi A, Fukazawa C (1987) *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 144-152.

Baïda N, Yazourh A, Singer E, Izard D (2001) *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Research in Microbiology* **152**(5), 493-502.

Bajolet-Laudinat O, Girod-de Bentzmann S, Tournier JM, Madoulet C, Plotkowski MC, Chippaux C, Puchelle E (1994) Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infection and Immunity* **62**, 4481-4487.

Baida N, Yazourh A, Singer E, Izard D (2002) *Pseudomonas grimontii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(5), 1497-1503.

Balandreau J, Mavingui P (2007) Beneficial interactions of *Burkholderia* spp. with plants. In 'Burkholderia: Molecular Microbiology and genomics'. (Eds T Coenye, P Vandamme) pp. 141-142. (Horizon Bioscience).

Baldani JI, Pot B, *et al.* (1996) Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(3), 802-810.

Baljer G, Barrett JT (1979) Demonstration of enterotoxin-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains in the intestinal ligature test in piglets. *Journal of veterinary medicine* **26**, 740-747.

Barbieri JT, Sun J (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. In 'Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology' pp. 79-92.

Baumann L, Baumann P, Mandel M, Allen RD (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of bacteriology* **110**(1), 402-429.

Baumann P, Baumann L, Bang S, Woolkalis M (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *beneckeae*, and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckeae*. *Current Microbiology* **4**(3), 127-132.

Baumann P, Baumann L, Bowditch RD, Beaman B (1984) Taxonomy of *Alteromonas*: *A. nigrifaciens* sp. nov., nom. rev.; *A. macleodii*; and *A. Haloplanktis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**(2), 145-149.

Baumann P, Bowditch RD, Baumann L, Beaman B (1983) Taxonomy of Marine *Pseudomonas* Species: *P. stanieri* sp. nov.; *P. perfectomarina* sp. nov., nom. rev.; *P. nautica*; and *P. doudoroffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(4), 857-865.

Baxter IA, Lambert PA (1994) Isolation and partial purification of a carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamase from *Pseudomonas cepacia*. *FEMS Microbiology Letters* **122**, 251-256.

Beaudeau P, de Valk H, Vaillant V, Mouly D (2007) Détection et investigation des épidémies d'infection liées à l'ingestion d'eau de distribution - Approche intégrée environnementale et sanitaire. InVS.

Behrendt U, Ulrich A, Schumann P (2003) Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(5), 1461-1469.

Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Eler W, Burghardt J, Seyfarth W (1999) A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: A proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**(1), 297-308.

- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Meyer J-M, Sproer C (2007) *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(5), 979-985.
- Bell SC, Turner JM (1973) Iodinin biosynthesis by a pseudomonad. *Biochemical Society Transactions* **1**(3), 751-753.
- Bennasar A, Rossello-Mora R, Lalucat J, Moore ERB (1996) 16S rRNA Gene Sequence Analysis Relative to Genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and Proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(1), 200-205.
- Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* **7**, 1673-1685.
- Berka RM, Vasil ML (1982) Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and preliminary characterization. *Journal of Bacteriology* **152**, 239-245.
- Bodilis J, Barray S (2006) Molecular evolution of the major outer-membrane protein gene (*oprF*) of *Pseudomonas*. *Microbiology* **152**, 1075-1088.
- Borella P, Montagna MT, *et al.* (2003) Relationship between mineral content of domestic hot water and microbial contamination. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **17**, 37-43.
- Borgmann-Strahsen R (2003) Comparative assessment of different biocides in swimming pool water. *International Biodeterioration and Biodegradation* **51**, 291-297.
- Bowman JP, Sly LI, Hayward AC (1988) *Pseudomonas mixta* sp. nov., a bacterium from soil with degradative activity on a variety of complex polysaccharides - Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB: List No. 29. *Systematic and Applied Microbiology* **11**, 53-69.
- Bowman JP, Sly LI, Hayward AC, Spiegel Y, Stackebrandt E (1993) *Telluria mixta* (*Pseudomonas mixta* Bowman, Sly, and Hayward 1988) gen. nov., comb. nov., and *Telluria chitinolytica* sp. nov., Soil-Dwelling Organisms Which Actively Degrade Polysaccharides. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(1), 120-124.
- Bozal N, Montes MJ, Mercade E (2007) *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(11), 2609-2612.
- Bressler D, Balzer M, Dannehl A, Flemming HC, Wingender J (2009) Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. In 'Water Science and Technology: Water Supply' pp. 81-87.
- Brown GR, Sutcliffe IC, Cummings SP (2001) Reclassification of [*Pseudomonas*] *doudoroffii* (Baumann *et al.* 1983) into the genus *Oceanomonas* gen. nov. as *Oceanomonas doudoroffii* comb. nov., and description of a phenol-degrading bacterium from estuarine water as *Oceanomonas baumannii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(1), 67-72.
- Buck AC, Cooke EM (1969) The fate of ingested *Pseudomonas aeruginosa* in normal persons. *Journal of Medical Microbiology* **2**, 521-525.
- Busing KH, Doll W, Freytag K (1953) Die Bakterienflora der medizinische Blutegel. *Archives of Microbiology* **19**(1), 52-86.
- Byrd JJ, Xu HS, Colwell RR (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 875-878.
- Camara B, Strompl C, Verborg S, Sproer C, Pieper DH, Tindall BJ (2007) *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of

degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(5), 923-931.

Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M (2006) Comparison of antibiotic susceptibility of Burkholderia cepacia complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **26**, 213-216.

Catara V, Sutra L, Morineau A, Achouak W, Christen R, Gardan L (2002) Phenotypic and genomic evidence for the revision of Pseudomonas corrugata and proposal of Pseudomonas mediterranea sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(5), 1749-1758.

Cervia JS, Canonica F, Ortolano G (2007) Water as a source of health care-associated infections [1]. *Archives of Internal Medicine* **167**, 92.

Chaidez C, Gerba CP (2004) Comparison of the microbiologic quality of point-of-use (POU)-treated water and tap water. *International Journal of Environmental Health Research* **14**, 253-260.

Christensen H, Boye M, Poulsen LK, Rasmussen OF (1994) Analysis of fluorescent pseudomonads based on 23S ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2196-2199.

Clark LL, Dajcs JJ, McLean CH, Bartell JG, Stroman DW (2006) Pseudomonas otitidis sp. nov., isolated from patients with otic infections. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 709-714.

Cobet AB, Wirsen C, Jones GE (1970) The Effect of Nickel on a Marine Bacterium, Arthrobacter marinus sp.nov. *Journal of General Microbiology* **62**(2), 159-169.

Coenye T, Laevens S, Gillis M, Vandamme P (2001) Genotypic and chemotaxonomic evidence for the reclassification of Pseudomonas woodsii (Smith 1911) Stevens 1925 as Burkholderia andropogonis (Smith 1911) Gillis *et al.* 1995. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(1), 183-185.

Coenye T, Vandamme P (2003) Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* **5**, 719-729.

Collins MD, Jones D, Keddie RM, Sneath PHA (1980) Reclassification of Chromobacterium iodinum (Davis) in a Redefined Genus Brevibacterium (Breed) as Brevibacterium iodinum nom.rev.; comb.nov. *Journal of General Microbiology* **120**, 1-10.

Coroler L, Elomari M, Hoste B, Gillis M, Izard D, H. L (1996) Pseudomonas rhodesiae sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. . *Systematic and Applied Microbiology* **19**(9), 600-607.

Correa CMC, Tibana A, Filho PPG (1991) Vegetables as a source of infection with Pseudomonas aeruginosa in a University and Oncology Hospital of Rio de Janeiro. *Journal of Hospital Infection* **18**(4), 301-306.

Crossman LC, Gould VC, *et al.* (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of Stenotrophomonas maltophilia reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology* **9**.

Curran B, Morgan JAW, Honeybourne D, Dowson CG (2005) Commercial mushrooms and bean sprouts are a source of Pseudomonas aeruginosa [2]. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5830-5831.

Dabboussi F, Hamze M, Elomari M, Verhille S, Baida N, Izard D, Leclerc H (1999) Taxonomic study of bacteria isolated from Lebanese spring waters: proposal for Pseudomonas cedrella sp. nov. and P. orientalis sp. nov. *Research in Microbiology* **150**(5), 303-316.

Dabboussi F, Hamze M, Singer E, Geoffroy V, Meyer JM, Izard D (2002) Pseudomonas mosselii sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(2), 363-376.

- Dalamaga M, Karmaniolas K, Chavelas C, Liatis S, Matekovits H, Migdalis I (2004) *Pseudomonas luteola* cutaneous abscess and bacteraemia in a previously healthy man. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **36**, 495-497.
- Davis DH, Stanier RY, Doudoroff M, Mandel M (1970) Taxonomic studies on some gram negative polarly flagellated "hydrogen bacteria" and related species. *Archiv für Mikrobiologie* **70**(1), 1-13.
- Davis GHG, Park RWA (1962) A taxonomic study of certain bacteria currently classified as *Vibrio* species. *Journal of General Microbiology* **27**, 101-119.
- De Ley J, Segers P, Gillis M (1978) Intra- and intergeneric similarities of *Chromobacterium* and *Janthinobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**(2), 154-168.
- De Vos P, Kersters K, Falsen E, Pot B, Gillis M, Segers P, De Ley J (1985) *Comamonas* Davis and Park 1962 gen. nov., nom. rev. emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**(4), 443-453.
- De Vos D, Bouton C, Sarniguet A, De Vos P, Vauterin M, Cornelis P (1998) Sequence diversity of the *oprI* gene, coding for major outer membrane lipoprotein I, among rRNA group I pseudomonads. *Journal of Bacteriology* **180**, 6551-6556.
- De Vos P, Van Landschoot A, *et al.* (1989) Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid: Ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 35-49.
- Dejli J, Chibani A, Zouhdi M, El Messoui M, Alaoui MA, El Yachoui M (2000) Antibiorésistance de certains germes isolés dans les aliments en milieu hospitalier (CHU Avicenne, Rabat). *Médecine et maladies infectieuses* **30**(10), 661-664.
- Delafield FP, Cooksey KE, Doudoroff M (1965) beta-Hydroxybutyric dehydrogenase and dimer hydrolase of *Pseudomonas lemoignei*. *Journal of Biological Chemistry* **240**(10), 4023-4028.
- Delaporte B, Raynaud M, Daste P (1961) A soil bacterium capable of utilizing, as a source of carbon, the fixed fraction of certain oleoresins. *Pseudomonas resinovorans* n. sp. *Les Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **13**(252), 1073-1075.
- Delorme S, Lemanceau P, Christen R, Corberand T, Meyer JM, Gardan L (2002) *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(2), 513-523.
- Denner EBM, Kampf P, Busse H-J, Moore ERB (1999) Note: Reclassification of *Pseudomonas echinoide* Heumann 1962, 343AL, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas echinoide* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**(3), 1103-1109.
- Dignani MC, Graziutti M, Anaissie EJ (2003) *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **24**, 89-98.
- Ding L, Yokota A (2004) Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(6), 2223-2230.
- Dobson SJ, Franzmann PD (1996) Unification of the genera *Deleya* (Baumann *et al.* 1983), *Halomonas* (Vreeland *et al.* 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family Halomonadaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(2), 550-558.

- Dubinina G, Zhdanov AV (1975) Recognition of the iron bacteria "Siderocapsa" as arthrobacters and the description of *Arthrobacter siderocapsulatus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **25**, 340-350.
- Dubrou S (2010) Communication personnelle.
- Eckmanns T, Oppert M, Martin M, Amorosa R, Zuschneid I, Frei U, Raden H, Weist K (2008) An outbreak of hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infection* **14**, 454-458.
- Edberg SC, Gallo P, Kontnick C (1996) Analysis of the virulence characteristics of bacteria isolated from bottled, water cooler, and tap water. *Microbial Ecology in Health and Disease* **9**, 67-77.
- Elomari M, Coroler L, Hoste B, Gillis M, Izard D, Leclerc H (1996) DNA Relatedness among *Pseudomonas* Strains Isolated from Natural Mineral Waters and Proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(4), 1138-1144.
- Elomari M, Coroler L, Verhille S, Izard D, Leclerc H (1997) *Pseudomonas monteillii* sp. nov., isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(3), 846-852.
- Emtiazi F, Schwartz T, Marten SM, Krolla-Sidenstein P, Obst U (2004) Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research* **38**, 1197-1206.
- Ernst RK, Hajjar AM, Tsai JH, Moskowitz SM, Wilson CB, Miller SI (2003) *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *Journal of Endotoxin Research* **9**, 395-400.
- Escalante AE, Caballero-Mellado J, Martinez-Aguilar L, Rodriguez-Verdugo A, Gonzalez-Gonzalez A, Toribio-Jimenez J, Souza V (2009) *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Cienegas valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6), 1416-1420.
- Exner M, Kramer A, Lajoie L, Gebel J, Engelhart S, Hartemann P (2005) Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *American Journal of Infection Control* **33**(5),supp1, S26-40.
- Fendrich C (1989) *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Systematic and Applied Microbiology* **11**, 36-43.
- Fernandez RO, Pizarro RA (1996) Lethal effect induced in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to ultraviolet-A radiation. *Photochemistry and Photobiology* **64**, 334-339.
- Festy B, Squinazi F, Montout G, Collignon A (1985) Les risques de contamination microbiologiques des réseaux de distribution intérieurs aux immeubles. *Le Pharmacien Biologiste* **19**, 49-58.
- Fitzgerald GP, DerVartanian ME (1969) *Pseudomonas aeruginosa* for the evaluation of swimming pool chlorination and algicides. *Applied microbiology* **17**, 415-421.
- Fraylick JE, Riese MJ, Vincent TS, Barbieri JT, Olson JC (2002) ADP-ribosylation and functional effects of *Pseudomonas* exoenzyme S on cellular RalA. *Biochemistry* **41**, 9680-9687.
- Freije MR (2005) Formulating a risk reduction strategy for waterborne pathogens in hospital water systems. *American Journal of Infection Control* **33**.
- Gardan L, Bella P, Meyer JM, Christen R, Rott P, Achouak W, Samson R (2002) *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6), 2065-2074.

Gardan L, Bollet C, Abu Ghorrah M, Grimont F, Grimont PAD (1992) DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 606-612.

Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PAD (1999) DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**(2), 469-478.

Garrity GM (2005) The Proteobacteria - Part B: The Gammaproteobacteria. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. (Springer: New York).

Gauthier V, Redercher S, Block JC (1999) Chlorine inactivation of *Sphingomonas* cells attached to goethite particles in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 355-357.

Gauthier G, Gauthier M, Christen R (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 755-761.

Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P, Bertrand JC (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(4), 568-576.

Gennari M, Dragotto F (1992) A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *Journal of Applied Bacteriology* **72**, 281-288.

George SE, Kohan MJ, Walsh DB, Claxton LD (1989) Acute colonization study of polychlorinated biphenyl-degrading pseudomonads in the mouse intestinal tract: Comparison of single and multiple exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 123-131.

George SE, Kohan MJ, Whitehouse DA, Creason JP, Kawanishi CY, Sherwood RL, Claxton LD (1991) Distribution, clearance, and mortality of environmental pseudomonads in mice upon intranasal exposure. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2420-2425.

Gillis M, Van Van T, *et al.* (1995) Polyphasic Taxonomy in the Genus *Burkholderia* Leading to an Emended Description of the Genus and Proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-Fixing Isolates from Rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**(2), 274-289.

Golas I, Filipkowska Z, Lewandowska D, Zmyslowska I (2002) Potentially Pathogenic Bacteria from the Family Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* sp. and *Aeromonas* sp. in Waters Designated for Drinking and Household Purposes. *Polish Journal of Environmental Studies* **11**, 325-330.

Gonzalez JM, Mayer F, Moran MA, Hodson RE, Whitman WB (1997) *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., Two Marine Bacteria from a Lignin-Rich Pulp Mill Waste Enrichment Community. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 369-376.

Goto M (1983) *Pseudomonas ficuserectae* sp. nov., the Causal Agent of Bacterial Leaf Spot of *Ficus erecta* Thunb. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(3), 546-550.

Gourmelon M, Cillard J, Pommepuy M (1994) Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: Oxidative stress hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 105-112.

Grabinska-Loniewska A, Wardzynska G, Pajor E, Korsak D, Boryn K (2007) Transmission of specific groups of bacteria through water distribution system. *Polish Journal of Microbiology* **56**, 129-138.

- Graindorge A, Menard A, Neto M, Bouvet C, Miollan R, Gaillard S, de Montclos H, Laurent F, Cournoyer B (2009) Epidemiology and molecular characterization of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **66**, 29-40.
- Gray PHH, Thornton HG (1928) The estimation of bacterial numbers in soil by direct counts from stained films [4]. *Nature* **122**(3072), 400-401.
- Green PN, Bousfield IJ (1983) Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, and Hanson 1976; *Methylobacterium rhodium* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov. corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(4), 875-877.
- Grimes DJ, Woese CR, MacDonell MT, Colwell RR (1997) Systematic Study of the Genus *Vogesella* gen. nov. and Its Type Species, *Vogesella indigofera* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(1), 19-27.
- Grobe S, Wingender J, Flemming HC (2001) Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **204**, 139-142.
- Guasp C, Moore ERB, Lalucat J, Bennasar A (2000) Utility of internally transcribed 16S-23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1629-1639.
- Gupta SK, Kumari R, Prakash O, Lal R (2008) *Pseudomonas panipatensis* sp. nov., isolated from an oil-contaminated site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(6), 1339-1345.
- Hagedorn C, Gould WD, Bardinelli TR, Gustavson DR (1987) A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2265-2268.
- Hansen AJ, Weeks OB, Colwell RR (1965) Taxonomy of *Pseudomonas piscicida* (Bein) Buck, Meyers and Leifson. *Journal of Bacteriology* **89**, 752-761.
- Hardalo C, Edberg SC (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology* **23**(1), 47-75
- Hatayama K, Kawai S, Shoun H, Ueda Y, Nakamura A (2005) *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(4), 1539-1544.
- Hauser E, Kampfer P, Busse H-J (2004) *Pseudomonas psychrotolerans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5), 1633-1637.
- Haynes WC, Burkholder WH (1957) Genus I. *Pseudomonas* 1894. In 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.' 7th edn. (Eds RS Breed, RGE Murray and NR Smith) pp. 89-152. (Williams & Wilkins: Baltimore)
- Hebert AM, Vreeland RH (1987) Phenotypic Comparison of Halotolerant Bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**(4), 347-350.
- Hentges DJ, Stein AJ, Casey SW, Que JU (1985) Protective role of intestinal flora against infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice: Influence of antibiotics on colonization resistance. *Infection and Immunity* **47**, 118-122.
- Heumann W (1962) Genetische Untersuchung Sternbildender Bakterien. *Zeitschrift für Vererbungslehre* **93**(3), 441-452.

- Heurlier K, Dénervaud V, Haenni M, Guy L, Krishnapillai V, Haas D (2005) Quorum-sensing-negative (lasR) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *Journal of Bacteriology* **187**, 4875-4883.
- Hildebrand DC, Palleroni NJ, Henderson M, Toth J, Johnson JL (1994) *Pseudomonas flavescens* sp. nov., Isolated from Walnut Blight Cankers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**(3), 410-415.
- Hirayama T, Noda M, Matsuda F (1984) Binding of pseudomonal leukocidin to rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity* **46**, 631-634.
- Hoefel D, Monis PT, Grooby WL, Andrews S, Saint CP (2005) Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 175-186.
- Holmes B, Owen RJ, Evans A (1977) *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment, and other sources. *International Journal of Systematic Bacteriology* **27**(2), 133-146.
- Horing E, Gopfert D, Schroter G, Von Gaisberg U (1991) Frequency and spectrum of microorganisms isolated from biopsy specimens in chronic colitis. *Endoscopy* **23**, 325-327.
- Howard K, Inglis TJJ (2003) The effect of free chlorine on *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Research* **37**, 4425-4432.
- Howard K, Inglis TJJ (2005) Disinfection of *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Research* **39**, 1085-1092.
- Hu FP, Young JM, Stead DE, Goto M (1997) Transfer of *Pseudomonas cissicola* (Takimoto 1939) Burkholder 1948 to the Genus *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(1), 228-230.
- Hu FP, Young JM, Triggs CM (1991) Numerical analysis and determinative tests for nonfluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**(4), 516-525.
- Huang H-I, Shih H-Y, Lee C-M, Yang TC, Lay J-J, Lin YE (2008) In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: Implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Research* **42**, 73-80.
- Hugh R (1981) *Pseudomonas maltophilia* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**(2), 195.
- Hwang C, Zhang G, Kang S, Kim H, Cho B (2009) *Pseudomonas pelagia* sp. nov., isolated from a culture of the Antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(12), 3019-3024.
- Iglewski BH, Burns RP, Gipson IK (1977) Pathogenesis of corneal damage from *Pseudomonas* exotoxin A. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **16**, 73-76.
- Iizuka H, Komagata K (1963) New species of *Pseudomonas* belonged to fluorescent group (Studies on the microorganisms of cereal grains. Part V). *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* **37**, 137-141.
- Iizuka H, Komagata K (1964) Microbiological studies on petroleum and natural gas. II. Determination of pseudomonads. *The Journal of General and Applied Microbiology* **10**(3), 207-221.
- Imanaka H, Kousaka M, Tamura G, Arima K (1965) Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. II. *Journal of Antibiotics* **18**, 205-206.

- Imberty A, Wimmerova M, Mitchell EP, Gilboa-Garber N (2004) Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: Insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes and Infection* **6**, 221-228.
- Ito H, Iizuka H (1971) Taxonomic studies on a radio-resistant *Pseudomonas*. XII. Studies on the microorganisms of cereal grain. *Agricultural Biology and Chemistry* **35**, 1566- 1571.
- Ivanova EP, Gorshkova NM, *et al.* (2002) *Pseudomonas extremorientalis* sp. nov., isolated from a drinking water reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6), 2113-2120.
- Janse JD (1982) *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on Oleaceae and Nerium oleander L. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**(2), 166-169.
- Janse JD, Derks JHJ, Spit BE, Van der Tuin WR (1997) Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria, including *P. marginalis* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 538-553.
- Jendrossek D (2001) Transfer of [*Pseudomonas*] *lemoinei*, a Gram-negative rod with restricted catabolic capacity, to *Paucimonas* gen. nov. with one species, *Paucimonas lemoinei* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(3), 905-908.
- Johnson JC (1956) Pod twist: a previously unrecorded bacterial disease of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Queensland Journal of Agricultural Science* **13**, 127-158.
- Joyeux M (2010) Communication personnelle.
- Jungfer C, Schwartz T, Obst U (2007) UV-induced dark repair mechanisms in bacteria associated with drinking water. *Water Research* **41**, 188-196.
- Kadota H (1951) "Studies on the biochemical activities of marine bacteria. I. On the agar-decomposing bacteria in the sea. *Memoirs of the College of Science, Kyoto University* **59**, 54-67.
- Kampfer P, Denner EBM, Meyer S, Moore ERB, Busse H-J (1997) Classification of "Pseudomonas azotocolligans" Anderson 1955, 132, in the Genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas trueperi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(2), 577-583.
- Kampfer P, Falsen E, Busse H-J (2008) Reclassification of *Pseudomonas mephitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthinobacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley *et al.* 1978. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(1), 136-138.
- Kampfer P, Neef A, Salkinoja-Salonen MS, Busse HJ (2002) *Chelatobacter heintzii* (Auling *et al.* 1993) is a later subjective synonym of *Aminobacter aminovorans* (Urakami *et al.* 1992). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(3), 835-839.
- Kawai Y, Yabuuchi E (1975) *Pseudomonas pertucinogena* sp.nov., an Organism Previously Misidentified as *Bordetella pertussis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **25**(4), 317-323.
- Kerstens K, Ludwig W, Vancanneyt M, de Vos P, Gillis M, Schleifer KH (1996) Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 465- 477.
- Kerstens I, Huys G, Van Duffel H, Vancanneyt M, Kersters K, Verstraete W (1996a) Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **80**, 266-276.
- Kerstens K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Gillis M, Schleifer KH (1996b) Recent changes in the classification of the pseudomonads: An overview. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 465-477.

- Khan NH, Ahsan M, Yoshizawa S, Hosoya S, Yokota A, Kogure K (2008) Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6194-6205.
- Khardori N, Elting L, Wong E, Schable B, Bodey GP (1990) Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) in patients with cancer. *Reviews of Infectious Diseases* **12**, 997-1003.
- Kim K-H, Roh SW, Chang H-W, Nam Y-D, Yoon J-H, Jeon CO, Oh H-M, Bae J-W (2009) *Pseudomonas sabulinigri* sp. nov., isolated from black beach sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(1), 38-41.
- Kiratisin P, Santanirand P, Chantratita N, Kaewdaeng S (2007) Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **59**, 277-281.
- Kluyver AJ (1956) *Pseudomonas aureofaciens* nov. spec. and its pigments. *Journal of bacteriology* **72**(3), 406-411.
- Kodama K, Kimura N, Komagata K, (1985) Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 467-474
- Koenig DW, Mishra SK, Pierson DL (1995) Removal of *Burkholderia cepacia* biofilms with oxidants. *Biofouling* **9**, 51-62.
- Koh AY, Priebe GP, Pier GB (2005) Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infection and Immunity* **73**, 2262-2272.
- Kurath G, Morita RY (1983) Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1206-1211.
- Kurita T, Tabei H (1967) On the pathogenic bacterium of bacterial grain rot of rice. *Ann Phytopath. Soc. Japan* **33**(111).
- Kwon SW, Kim JS, Park IC, Yoon SH, Park DH, Lim CK, Go SJ (2003) *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsungensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(1), 21-27.
- Labonde J, Festy B (1979) Bilan d'une recherche systématique de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux de consommation. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon* **12**, 507-517.
- Lahti K (1993) Microbial quality of drinking water in some Finnish distribution systems. *Water Science and Technology* **27**, 151-154.
- Lai Q, Shao Z (2008) *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(8), 1911-1915.
- Lalucat J, Pares R, Schlegel HG (1982) *Pseudomonas taeniospiralis* sp. nov., an R-body-containing hydrogen bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**(3), 332-338.
- Lambert B, Meire P, Joos H, Lens P, Swings J (1990) Fast-growing, aerobic, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3375-3381.
- Lang E, Griese B, Sproer C, Schumann P, Steffen M, Verberg S (2007) Characterization of '*Pseudomonas azelaica*' DSM 9128, leading to emended descriptions of *Pseudomonas citronellolis* Seubert 1960 (Approved Lists 1980) and *Pseudomonas nitroreducens* Iizuka and Komagata 1964 (Approved Lists 1980), including *Pseudomonas multiresinivorans* as its later heterotypic synonym. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(4), 878-882.

- Laughlin RS, Musch MW, Hollbrook CJ, Rocha FM, Chang EB, Alverdy JC (2000) The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Annals of Surgery* **232**, 133-142.
- Lavenir R (2007) Les populations de *Pseudomonas aeruginosa* en milieux hydriques : Evidences de prédispositions naturelles et d'adaptations génétiques Lyon 1.
- Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, Crouzet O, Laurent F, Kravtsoff J, Mazoyer MA, Cournoyer B (2008) Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: Invasion and selection of clonal complexes. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 1491-1501.
- Lavigne JP, Gaillard JB, Bourg G, Tichit C, Lecaillon E, Sotto A (2008) Etude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE : détection de CTX-M et étude de la virulence *Pathologie Biologie* **56**, 447-453.
- Leclerc H, Moreau A (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews* **26**, 207-222.
- Lee M, Chandler AC (1941) A study of the nature, growth and control of bacteria in cutting products. *Journal of Bacteriology* **4**(3), 373-386.
- Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C (1999) Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: A 5-year study. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 153-158.
- Leifson E (1962) The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature Taxonomy* **12**, 161-170.
- Leifson E, Hugh R (1954) A new type of polar monotrichous flagellation. *Journal of general microbiology* **10**(1), 68-70.
- Levesque B, Simard P, Gauvin D, Gingras S, Dewailly E, Letarte R (1994) Comparison of the microbiological quality of water coolers and that of municipal water systems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1174-1178.
- Levine M, Anderson DQ (1932) Two New Species of Bacteria Causing Mustiness in Eggs. *Journal of Bacteriology* **23**(4), 337-347. .
- Lezcano I, Pérez Rey R, Baluja C, SÁnchez E (1999) Ozone inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella typhimurium* in water. *Ozone: Science and Engineering* **21**, 293-300.
- Liaw SJ, Lee YL, Hsueh PR (2010) Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents* **35**, 126-130.
- Liu M, Luo X, Zhang L, Dai J, Wang Y, Tang Y, Li J, Sun T, Fang C (2009) *Pseudomonas xinjiangensis* sp. nov., a moderately thermotolerant bacterium isolated from desert sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6), 1286-1289.
- Liu R, Liu H, Feng H, Wang X, Zhang C-X, Zhang K-Y, Lai R (2008) *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(6), 1404-1408.
- Livermore DM (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases* **34**, 634-640.

- Long J, Zaborina O, Holbrook C, Zaborin A, Alverdy J (2008) Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery* **144**, 189-197.
- Looney WJ, Narita M, Mahlemann K (2009) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *The Lancet Infectious Diseases* **9**, 312-323.
- Lory S, Wolfgang M, Lee V, Smith R (2004) The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *International Journal of Medical Microbiology* **293**, 479-482.
- Lyons CM, Justin P, Colby J, Williams E (1984) Isolation, Characterization and Autotrophic Metabolism of a Moderately Thermophilic Carboxydobacterium, *Pseudomonas thermocarboxydovorans* sp. nov. *Journal of General Microbiology* **130**(5), 1097-1105.
- Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson CG (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: Opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 1539-1551.
- Manaia CM, Moore ERB (2002) *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6), 2203-2209.
- Manceau C, Horvais A (1997) Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2), 498-505.
- Maragakis LL, Chaiwarith R, Srinivasan A, Torriani FJ, Avdic E, Lee A, Ross TR, Carroll KC, Perl TM (2009) *Sphingomonas paucimobilis* bloodstream infections associated with contaminated intravenous fentanyl. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 12-18.
- Marcus PI, Talalay P (1956) Induction and purification of alpha- and beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *The Journal of biological chemistry* **218**(2), 661-674.
- Mena KD, Gerba CP (2009) Risk assessment of *pseudomonas aeruginosa* in water. In 'Reviews of Environmental Contamination and Toxicology' pp. 71-115.
- Merlani GM, Francioli P (2003) Established and emerging waterborne nosocomial infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* **16**, 343-347.
- Messi P, Guerrieri E, Bondi M (2005) Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Science of the Total Environment* **346**, 213-219.
- Meyer O, Lalucat J, Schlegel HG (1980) *Pseudomonas carboxydohydrogena* (Sanjjeva and Zavarzin) comb. nov., a Monotrichous, Nonbudding, Strictly Aerobic, Carbon Monoxide-Utilizing Hydrogen Bacterium Previously Assigned to *Seliberia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**(1), 189-195.
- Meyer O, Schlegel HG (1978) Reisolation of the carbon monoxide utilizing hydrogen bacterium *Pseudomonas carboxydovorans* (Kistner) comb. nov. *Archives of Microbiology* **118**(1), 35-43.
- Meyer O, Stackebrandt E., Auling G. (1993) Transfer of [*Pseudomonas*] *carboxydovorans* OM5T to *Oligotropha*, gen. nov., as *Oligotropha carboxidovorans*, comb. nov., transfer of [*Alcaligenes*] *carboxydus* DSM 1086T to *Carbophilus*, gen. nov., as *Carbophilus carboxidus*, comb. nov., transfer of [*Pseudomonas*] *compransoris* DSM 1231T to *Zavarzinia*, gen. nov., as *Zavarzinia compransoris*, comb. nov., and amended description of the New genera. **16**(3), 390-395.
- Ministère de la Santé et des Solidarités (2005) L'eau dans les établissements de santé - Guide technique.
- Miyajima K, Tani A, Akita T (1983) *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(3), 656-657.

- Miyano N, Oie S, Kamiya A (2003) Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **26**, 671-674.
- Mohn W, Wilson A, Bicho P, Moore E (1999) Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Systematic and Applied Microbiology* **22**(1), 68-78.
- Molin G, Ternstrom A, Ursing J (1986) Notes: *Pseudomonas lundensis*, a New Bacterial Species Isolated from Meat. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**(2), 339-342.
- Monias BL (1928) Classification of *Bacterium Alcaligenes*, *Pyocyanum*, and *Fluorescens*. *The Journal of Infectious Diseases* **43**(4), 330-334.
- Moniz L (1963) Leaf-spot of apple-blossom. *Current Science* **32**(177).
- Moore JE, McIlhatton B, Shaw A, Murphy PG, Stuart Elborn J (2001) Occurrence of *Burkholderia cepacia* in foods and waters: Clinical implications for patients with cystic fibrosis. *Journal of Food Protection* **64**, 1076-1078.
- Moreira L, Agostinho P, Vasconcellos P, Morais V, Da Costa MS (1994) Survival of allochthonous bacteria in still mineral water bottled in polyvinyl chloride (PVC) and glass. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 334-339.
- Moritz MM, Flemming HC, Wingender J (2010) Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.
- Mouterde O, Vassal S, Malandin J, Massot J, Mallet E (1995) *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* dans l'environnement d'enfants atteints de mucoviscidose. *Médecine et maladies infectieuses* **25**, 727-732.
- Munsch P, Alatossava T, Marttinen N, Meyer JM, Christen R, Gardan L (2002) *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6), 1973-1983.
- Nakagawa Y, Sakane T, Yokota A (1996) Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*" (Foster 1944), a Gram-Negative, Motile Rod with Long-Chain 3-Hydroxy Fatty Acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(1), 16-22.
- Nishimori E, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H (2000) *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(1), 83-89.
- Noble RC, Overman SB (1994) *Pseudomonas stutzeri* infection: A review of hospital isolates and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **19**, 51-56.
- Nordmann P (2006) chapitre 16: b-lactamines et *Pseudomonas aeruginosa*. In 'Antibiogramme'. (Ed. ESKA) pp. 163-177 Paris).
- Nozhevnikova AN, Zavarzin GA (1974) Taxonomy of CO oxidizing gram negative bacteria (Russian). *Izvestiya Akademii Nauk SSSR - Seriya Biologicheskaya* **no. 3**, 436-440.
- Ogimi C (1981) Studies on bacterial gall of chinaberry (*Melia Azedarach* Lin.), caused by *Pseudomonas meliae* n. sp. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**, 382-383.
- OMS (Ed.) (2004) 'Guidelines for drinking-water quality - volume 1 recommendations.' (Geneve).
- OMS (2008) Guidelines for Drinking-water Quality - Volume 1 Recommendations. (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html).

- Palleroni NJ, Moore ERB (2004) Taxonomy of *Pseudomonas*: experimental approaches. In 'Pseudomonas'. (Ed. JL Ramos) pp. 3-47. (Plenum: New York).
- Palleroni NJ, Bradbury JF (1993) *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(3), 606-609.
- Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY, Solanes RE, Mandel M (1970) Taxonomy of the Aerobic Pseudomonads: the Properties of the *Pseudomonas stutzeri* Group. *Journal of General Microbiology* **60**(2), 215-231.
- Palleroni NJ, Holmes B (1981) *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**, 479-481.
- Pandey KK, Mayilraj S, Chakrabarti T (2002) *Pseudomonas indica* sp. nov., a novel butane-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(5), 1559-1567.
- Papapetropoulou M, Iliopoulou J, Rodopoulou G, Detorakis J, Paniara O (1994) Occurrence and antibiotic-resistance of pseudomonas species isolated from drinking water in southern Greece. *Journal of Chemotherapy* **6**, 111-116.
- Park Y-D, Lee HB, Yi H, Kim Y, Bae KS, Choi J-E, Jung HS, Chun J (2005) *Pseudomonas panacis* sp. nov., isolated from the surface of rusty roots of Korean ginseng. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(4), 1721-1724.
- Park Y-D, Yi H, Baik KS, Seong CN, Bae KS, Moon EY, Chun J (2006) *Pseudomonas segetis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(11), 2593-2595.
- Payment P, Gamache F, Paquette G (1988) Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 1304-1309.
- Payne WJ, Eagon RG, Williams AK (1961) Some observations on the physiology of *Pseudomonas natriegens* nov. spec. *Antonie van Leeuwenhoek* **27**(1), 121-128.
- Peconek J, Gruber C, Gallego V, Ventosa A, Busse H-J, Kampfer P, Radax C, Stan-Lotter H (2006) Reclassification of *Pseudomonas beijerinckii* Hof 1935 as *Chromohalobacter beijerinckii* comb. nov., and emended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(8), 1953-1957.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Journal of Hospital Infection* **70**, 361-368.
- Peix A, Berge O, Rivas R, Abril A, Velazquez E (2005) *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(3), 1107-1112.
- Peix A, Rivas R, Mateos PF, Martinez-Molina E, Rodriguez-Barrueco C, Velazquez E (2003) *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(6), 2067-2072.
- Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, Mateos PF, Martinez-Molina E, Rodriguez-Barrueco C, Velazquez E (2004) *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(3), 847-850.
- Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Ramirez-Bahena MH, Mateos PF (2007) Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov., and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1286-1290.

- Peix A, Ramirez-Bahena MH, Velázquez E (2009) Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 1132-1147.
- Percival SL, Knapp JS, Edyvean RGJ, Wales DS (1998) Biofilms, mains water and stainless steel. *Water Research* **32**, 2187-2201.
- Perola O, Nousiainen T, Suomalainen S, Aukee S, Kärkkäinen U-M, Kauppinen J, Ojanen T, Katila M-L (2002) Recurrent *Sphingomonas paucimobilis*-bacteraemia associated with a multi-bacterial water-borne epidemic among neutropenic patients. *Journal of Hospital Infection* **50**, 196-201.
- Philippon A (2006) beta-lactamines et bacilles à Gram négatif non fermentaires. In 'Antibiogramme'. (Eds P Courvalin, R Leclercq, E Bingen) p. 179. (ESKA).
- Phillips RM, Six DA, Dennis EA, Ghosh P (2003) In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A2 Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 41326-41332.
- Picao RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P (2009) Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**, 2225-2226.
- Pier GB, Meluleni G, Neuger E (1992) A murine model of chronic mucosal colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **60**, 4768-4776.
- Pirnay JP, Bilocq F, *et al.* (2009) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS ONE* **4**.
- Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Plasiat P, Nordmann P (2009) Naturally occurring class A beta-lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**, 876-882.
- Pope CF, Gillespie SH, Pratten JR, McHugh TD (2008) Fluoroquinolone-resistant mutants of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 1201-1203.
- Price D, Ahearn DG (1988) Incidence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in whirlpools. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 1650-1654.
- Prakash O, Kumari K, Lal R (2007) *Pseudomonas delhiensis* sp. nov., from a fly ash dumping site of a thermal power plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(3), 527-531.
- Psallidas PG, Panagopoulos CG (1975) A new bacteriosis of almond caused by *Pseudomonas amygdali* sp. nov. *Ann Inst Phytopathol Benaki* **11**, 94-108.
- Pungrasmi W, Lee H-S, Yokota A, Ohta A (2008) *Pseudomonas japonica* sp. nov., a novel species that assimilates straight chain alkylphenols. *The Journal of General and Applied Microbiology* **54**(1), 61-69.
- Ralston E, Palleroni NJ, Doudoroff M (1973) *Pseudomonas pickettii*, a new species of clinical origin related to *Pseudomonas solanacearum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**(1), 15-19.
- Rao TS, Kesavamoorthy R, Babu Rao C, Nair KVK (1997) Influence of flow on ordering characteristics of a bacterial biofilm. *Current Science* **73**, 69-74.
- Redding PJ, McWalter PW (1980) *Pseudomonas fluorescens* cross-infection due to contaminated humidifier water. *British Medical Journal* **281**, 275.
- Reddy GSN, Matsumoto GI, Schumann P, Stackebrandt E, Shivaji S (2004) Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(3), 713-719.

- Restaino L, Frampton EW, Hemphill JB, Palnikar P (1995) Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3471-3475.
- Ribas F, Perramon J, Terradillos A, Frias J, Lucena F (2000) The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 704-710.
- Robbs CF (1956) Uma nova doença bacteriana do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Revista da Sociedade Brasileira de Agronomia* **12**, 73-76.
- Roberts S, Eden-Green S, Jones P, Ambler D (1990) *Pseudomonas syzygii*, sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Systematic and Applied Microbiology* **13**(1), 34-43.
- Rollet C, Gal L, Guzzo J (2009) Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: A comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* **290**, 135-142.
- Rolston KVI, Bodey GP (1992) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cancer patients. *Cancer Investigation* **10**, 43-59.
- Romanenko LA, Uchino M, Falsen E, Frolova GM, Zhukova NV, Mikhailov VV (2005) *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(2), 919-924.
- Romanenko LA, Uchino M, Falsen E, Lysenko AM, Zhukova NV, Mikhailov VV (2005b) *Pseudomonas xanthomarina* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian. *Journal of General and Applied Microbiology* **51**, 65-71.
- Romanenko LA, Uchino M, Tebo BM, Tanaka N, Frolova GM, Mikhailov VV (2008) *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(3), 706-710.
- Rose H, Baldwin A, Dowson CG, Mahenthalingam E (2009) Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63**, 502-510.
- Rossolini GM, Mantengoli E (2005) Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection, Supplement* **11**, 17-32.
- Rusin PA, Rose JB, Haas CN, Gerba CP (1997) Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **152**, 57-83.
- Sagripanti JL, Bonifacino A (2000) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms. *Journal of AOAC International* **83**, 1415-1422.
- Sajjan US, Corey M, Karmali MA, Forstner JF (1992) Binding of *Pseudomonas cepacia* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **89**, 648-656.
- Sanchez MB, Hernandez A, Martinez JL (2009) *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiology* **4**, 655-660.
- Sanzhieva EU, Zavarzin GA (1971) Bacteria oxidizing carbon monoxide. *Bakteriia, oksiliiushchaia okis' ugheroda*. **196**(4), 956-958.
- Sarlangue J, Brissaud O, Labraze C (2006) Aspects cliniques de l'infection a *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives de Pédiatrie* **13 Suppl 1**.
- Satomi M, Kimura B, Hamada T, Harayama S, Fujii T (2002) Phylogenetic study of the genus *Oceanospirillum* based on 16S rRNA and *gyrB* genes: emended description of the genus *Oceanospirillum*, description of *Pseudospirillum* gen. nov., *Oceanobacter* gen. nov. and *Terasakiella* gen. nov. and transfer of *Oceanospirillum jannaschii* and *Pseudomonas stanieri* to *Marinobacterium* as

Marinobacterium jannaschii comb. nov. and Marinobacterium stanieri comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(3), 739-747.

Savulescu T (1947) Contribution à la classification des bacteriacées phytopathogènes. *Analele Academiei Romane* **3**(22).

Schaad NW, Postnikova E, *et al.* (2008) Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad *et al.*, 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **31**(6-8), 434-446.

Schaad NW, Sowell Jr G, Goth RW (1978) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**(1), 117-125.

Schimpff SC, Greene WH, Young VM, Wiernik PH (1973) *Pseudomonas* septicemia: incidence, epidemiology, prevention and therapy in patients with advanced cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **9**, 449-455.

Schmidt-Lorenz W, Bischofberger T, Cha SK (1990) A simple nutrient-tolerance (NT) test for the characterization of the different types of oligocarbotoleant and oligocarbophile water bacteria from non-carbonated mineral water. *International Journal of Food Microbiology* **10**, 157-176.

Segers P, Vancanneyt M, Pot B, Torck U, Hoste B, Dewettinck D, Falsen E, Kersters K, 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 Journal of Systematic Bacteriology* **44**(3), 499-510.

Seubert W (1960) Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms I., *Pseudomonas citronellolis* n. sp: Isolation and Characterization of an Isoprenoid-Degrading Bacterium. *Journal of Bacteriology* **79**(3), 426-434.

Shatz A, Howell C (1952) Growth and hydrogenase activity of a new bacterium, *Hydrogenomonas facilis*. *Journal of bacteriology* **63**, 87-98.

Shimizu K, Kikuchi K, Sasaki T, Takahashi N, Ohtsuka M, Ono Y, Hiramatsu K (2008) Smqnr, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 3823-3825.

Shooter RA, Gaya H, Cooke EM, Kumar P, Patel N, Parker MT, Thom BT, France DR (1969) Food and medicaments as possible sources of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **1**, 1227-1229.

Shrivastava R, Upreti RK, Jain SR, Prasad KN, Seth PK, Chaturvedi UC (2004) Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **58**, 277-283.

Sikorski J, Stackebrandt E, Wackernagel W (2001) *Pseudomonas kilonensis* sp. nov., a bacterium isolated from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(4), 1549-1555.

Silvestry-Rodriguez N, Bright KR, Uhlmann DR, Slack DC, Gerba CP (2007) Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* by silver in tap water. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **42**, 1579-1584.

Simon A, Krawtschenko O, Reiffert SM, Exner M, Trautmann M, Engelhart S (2008) Outbreaks of *Pseudomonas aeruginosa* in pediatric patients - Clinical aspects, risk factors and management. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* **3**, 249-269.

- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (1980) Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**(1), 225-420.
- Smith EF, Stapp C (Eds) (1911) 'Bacteria in relation to plant diseases.' Carnegie Institution of Washington publication.
- Soriano JM, Rico H, Moltó JC, Mañes J (2000) Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International Journal of Food Microbiology* **58**(1-2), 123-128.
- Sorokin DY, Tindall BJ (2006) The status of the genus name Halovibrio Fendrich 1989 and the identity of the strains Pseudomonas halophila DSM 3050 and Halomonas variabilis DSM 3051. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(2), 487-489.
- Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (2000) The causes of Pseudomonas diversity. *Microbiology* **146**, 2345-2350.
- Spinasse A (1988) Dégradation de la qualité des eaux dans les réseaux privés - constat sanitaire. *Tecniques Sciences Méthodes* **12**, 603-616.
- Spring S, Wagner M, Schumann P, Kampfer P (2005) Malikia granosa gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of Pseudomonas spinosa as Malikia spinosa comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(2), 621-629.
- Stanier R (1976) Reflexions sur la taxonomie des Pseudomonas. *Bulletin de l'institut Pasteur* **74**, 255-270.
- Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (1966) The Aerobic Pseudomonads a Taxonomic Study. *Journal of General Microbiology* **43**(2), 159-271.
- Stapp C (Ed.) (1928) 'Schizomycetes (Spaltpilze oder Bakterien).' In Paul Sorauer, (ed.)
- Stender H, Broomer A, Oliveira K, Perry-O'Keefe H, Hyldig-Nielsen JJ, Sage A, Young B, Coull J (2000) Rapid detection, identification, and enumeration of Pseudomonas aeruginosa in bottled water using peptide nucleic acid probes. *Journal of Microbiological Methods* **42**, 245-253.
- Stolz A, Busse H-J, Kampfer P (2007) Pseudomonas knackmussii sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(3), 572-576.
- Sundin C, Hallberg B, Forsberg A (2004) ADP-ribosylation by exoenzyme T of Pseudomonas aeruginosa induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton in vivo. *FEMS Microbiology Letters* **234**, 87-91.
- Sutic D, Dowson WJ (1959) An investigation of a serious disease of hemp (Cannabis sativa L.) in Yugoslavia. *Phytopathologische Zeitschrift* **34**, 307-314.
- Swings J, De Vos P, Van den Mooter M, De Ley J (1983) Transfer of Pseudomonas maltophilia Hugh 1981 to the genus Xanthomonas as Xanthomonas maltophilia (Hugh 1981) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(2), 409-413.
- Szita G, Gyenes M, Soos L, Rétfalvi T, Békési L, Csiko G, Bernath S (2007) Detection of Pseudomonas aeruginosa in water samples using a novel synthetic medium and impedimetric technology. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 42-46.
- Tachikawa M, Yamanaka K, Nakamuro K (2009) Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone: Science and Engineering* **31**, 3-9.
- Tamagnini LM, Gonzalez RD (1997) Bacteriological stability and growth kinetics of Pseudomonas aeruginosa in bottled water. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 91-94.

- Tamaoka J, Ha D-M, 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**(1), 52-59.
- Tanii A, Miyajima K, Akita T (1976) The sheath brown rot disease of rice plant and its causal bacterium, *Pseudomonas fuscovaginae* A. Tanii, K. Miyajima et T. Akita sp. nov. *Annals of the Phytopathological Society, Japan* **42**, 540-548.
- Teixeira P, Cunha J, Albano H, Ramalho R, Gibbs P (2001) Evaluation of survival patterns and cellular injury of *Pseudomonas aeruginosa* in different bottled waters stored under various conditions. *Journal of Food Safety* **21**, 167-180.
- Tvrzova L, Schumann P, Sproer C, Sedlacek I, Pacova Z, Sedo O, Zdrahal Z, Steffen M, Lang E (2006) *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(11), 2657-2663.
- Twining SS, Kirschner SE, Mahnke LA, Frank DW (1993) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **34**, 2699-2712.
- Uchino M, Shida O, Uchimura T, Komagata K (2001) Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology* **47**(5), 247-261.
- Urakami T, Ito-Yoshida C, Araki H, Kijima T, Suzuki K, Komagata K (1994) Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 235-245. .
- Vachee A, Leclerc H (1995) Propriétés antagonistes de la flore autochtone des eaux minérales naturelles vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal européen d'hydrologie* **26**, 327-338.
- Vachee A, Vincent P, Struijk CB, Mossel DAA, Leclerc 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 Damme PA, Johannes AG, Cox HC, Berends W (1960) On toxoflavin, the yellow poison of *Pseudomonas cocovenenans*. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 255-267.
- Van den Mooter M, Swings J (1990) Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**(4), 348-369.
- Van der Kooij D (1992) Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *Journal / American Water Works Association* **84**, 57-65.
- Van der Kooij D, Visser A, Oranje JP (1982) Multiplication of fluorescent pseudomonads at low substrate concentrations in tap water. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **48**, 229-243.
- Vandamme P, Holmes B, et al. (1997) Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(4), 1188-1200.
- Vanechoutte M, Kampfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(2), 317-327.

- Vanparys B, Heylen K, Lebbe L, De Vos P (2006) *Pseudomonas peli* sp. nov. and *Pseudomonas borbori* sp. nov., isolated from a nitrifying inoculum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(8), 1875-1881.
- Vela AI, Gutierrez MC, Falsen E, Rollan E, Simarro I, Garcia P, Dominguez L, Ventosa A, Fernandez-Garayzabal JF (2006) *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(11), 2671-2676.
- Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D, Leclerc H (1999) Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **22**(1), 45-48.
- Vess RW, Anderson RL, Carr JH, Bond WW, Favero MS (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.
- Viallard V, Poirier I, Cournoyer B, Haurat J, Wiebkin S, Ophel-Keller K, Balandreau J (1998) *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] phenazinium, [*Pseudomonas*] pyrrocinia and [*Pseudomonas*] glathei as *Burkholderia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**(2), 549-563.
- Wagner J, Short K, Catto-Smith AG, Cameron DJ, Bishop RF, Kirkwood CD (2008) Identification and characterisation of *Pseudomonas* 16S ribosomal DNA from ileal biopsies of children with Crohn's disease. *PLoS ONE* **3**.
- Wakabayashi H, Egusa S (1972) Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*) *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography* **38**, 577-587
- Ward NR, Wolfe RL, Olson BH (1984) Effect of pH, application technique, and chlorine-to-nitrogen ratio on disinfectant activity of inorganic chloramines with pure culture bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **48**, 508-514.
- Weber G, Werner HP, Matschnigg H (1971) *Pseudomonas aeruginosa* im Trinkwasser als Todesursache bei Neugeborenen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale* **216**(2), 210-214.
- Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI (1999) Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**(2), 567-576.
- Weon H-Y, Kim B-Y, Yoo S-H, Baek Y-K, Lee S-Y, Kwon S-W, Go S-J, Stackebrandt E (2006) *Pseudomonas pohangensis* sp. nov., isolated from seashore sand in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(9), 2153-2156.
- Wilkinson FH, Kerr KG (1998) Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *European Journal of Cancer Care* **7**, 12-14.
- Willems A, Busse J, *et al.* (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 carboxydoflava*"), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (Formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**(3), 319-333.
- Willems A, Falsen E, Pot B, Jantzen E, Hoste B, Vandamme P, Gillis M, Kersters K, 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**(4), 384-398.

Willems A, Goor M, Thielemans S, Gillis M, Kersters K, De Ley J (1992) Transfer of Several Phytopathogenic Pseudomonas Species to Acidovorax as Acidovorax avenae subsp. avenae subsp. nov., comb. nov., Acidovorax avenae subsp. citrulli, Acidovorax avenae subsp. cattleyae, and Acidovorax konjaci. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(1), 107-119.

Willems A, Pot B, Falsen E, Vandamme P, Gillis M, Kersters K, De Ley J (1991) Polyphasic Taxonomic Study of the Emended Genus Comamonas: Relationship to Aquaspirillum aquaticum, E. Falsen Group 10, and Other Clinical Isolates. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**(3), 427-444.

Wingender J, Flemming H-C (2004) 'Contamination potential of drinking water distribution network biofilms.'

Witt DJ, Craven DE, McCabe WR (1987) Bacterial infections in adult patients with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *American Journal of Medicine* **82**, 900-906.

Wolfe RL (1990) Ultraviolet disinfection of potable water. *Environmental Science and Technology* **24**, 768-773.

Wolterink A, Jonker AB, Kengen SWM, Stams AJM (2002) Pseudomonas chloritidismutans sp. nov., a non-denitrifying, chlorate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(6), 2183-2190.

Xiao G, Daziel E, et al. (2006) MvfR, a key Pseudomonas aeruginosa pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Molecular Microbiology* **62**, 1689-1699.

Xie C-H, Yokota A (2005) Reclassification of Alcaligenes latus strains IAM 12599T and IAM 12664 and Pseudomonas saccharophila as Azohydromonas lata gen. nov., comb. nov., Azohydromonas australica sp. nov. and Pelomonas saccharophila gen. nov., comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(6), 2419-2425.

Xin Y-H, Zhang D-C, Liu H-C, Zhou H-L, Zhou Y-G (2009) Pseudomonas tuomuerensis sp. nov., isolated from a bird's nest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(1), 139-143.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa 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 and Immunology* **36**(12), 1251-1275.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. Nov.: Proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. Nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology* **39**(11), 897-904.

Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, Hashimoto Y, Ezaki T, Yamamoto H (1990) Proposals of Sphingomonas paucimobilis gen. nov. and comb. nov., Sphingomonas parapaucimobilis sp. nov., Sphingomonas yanoikuyae sp. nov., Sphingomonas adhaesiva sp. nov., Sphingomonas capsulata comb. nov., and two genospecies of the genus Sphingomonas . . *Microbiology and Immunology* **34**(2), 99-119.

Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S (2000) Phylogeny of the genus Pseudomonas: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. *Microbiology* **146**, 2385-2394.

- Yoder J, Roberts V, *et al.* (2008) Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking--United States, 2005-2006. *MMWR. Surveillance summaries : Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries / CDC* **57**, 39-62.
- Yoon J-H, Kim H, Kang KH, Oh T-K, Park Y-H (2003) Transfer of *Pseudomonas elongata* Humm 1946 to the genus *Microbulbifer* as *Microbulbifer elongatus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(5), 1357-1361.
- Young J (1970) Drippy gill: a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* n. sp. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **13**, 977-990. .
- Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG, Robb CF (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. . *New Zealand Journal of Agricultural Research* **21**, 153-177.
- Yumoto I, Kusano T, Shingyo T, Nodasaka Y, Matsuyama H, Okuyama H (2001) Assignment of *Pseudomonas* sp. strain E-3 to *Pseudomonas psychrophila* sp. nov., a new facultatively psychrophilic bacterium. *Extremophiles* **5**(5), 343-349.
- Zaborin A, Romanowski K, *et al.* (2009) Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6327-6332.
- Zaborina O, Holbrook C, *et al.* (2008) Structure-function aspects of PstS in multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* **4**.
- Zamberlan da Silva ME, Santana RG, Guilhermetti M, Filho IC, Endo EH, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP (2008) Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211**, 504-509.
- Zanetti F, De Luca G, Stampi S (2000) Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 67-72.
- Zolg W, Ottow JC (1975) *Pseudomonas glathei* sp. nov., a new nitrogen-scavenging rod isolated from acid lateritic relicts in Germany. *Journal of Comparative Neurology* **164**(1), 287-299.
- Zuma FN, Lin J, Jonnalagadda SB (2009) Kinetics of inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous solutions by ozone aeration. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* **44**, 929-935.

ANNEXE A

Taxonomie des Pseudomonades

A1/ Classification des Pseudomonades : éléments explicatifs

C'est en 1894 que Migula proposa le genre *Pseudomonas* pour classer les bactéries possédant une ciliature monotriche⁵ ou multitriche⁶ dont l'espèce « *P. pyocyaneae* » (aujourd'hui *P. aeruginosa*). Jusque dans les années 70, la taxonomie s'est appuyée sur des méthodes seulement phénotypiques⁷ et ce genre est devenu un genre « fourre-tout » dans lequel furent classées toutes les bactéries à coloration de Gram négative⁸ et présentant un métabolisme non fermentaire. En 1975, la huitième édition du livre « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » recensait 294 espèces.

Dans les années 70 et 80 les outils d'analyse du patrimoine génétique amenèrent les taxonomistes à s'appuyer sur la structure de l'ADN évaluée par le ratio de la quantité des deux nucléotides Guanine et Cytosine sur la quantité totale de nucléotides. Ce critère intitulé G + C % qui a permis de redéfinir la notion de taxon est toujours considéré comme un indicateur taxonomique intéressant pour lequel une similitude observée d'au moins 90 % est estimée significative d'appartenance à un même genre. À ce critère s'ajoutèrent des tests d'hybridation ADN-ADN et ADN-ARN, qui ont conduit au regroupement en génomovars⁹ des souches présentant des caractères génotypiques similaires. Étaient considérées comme appartenant à un même génomovar des souches présentant plus de 70% d'homologie ou moins de 5°C de différence pour la température appliquée dans les opérations de dénaturation de leur ADN en laboratoire.

Ces nouveaux critères entraînèrent le démantèlement du genre *Pseudomonas* (Stanier, 1976) par l'éloignement distinctif du genre *Pseudomonas* des espèces du genre *Burkholderia* (G+C % de 64 à 68 %), du genre *Ralstonia* (G+C de 62 à 70 %), du genre *Acidovorax* (G+C de 62 à 67 %) ou du genre *Comamonas*, (G+C de 65 à 67%) (Palleroni et Moore, 2004).

Suite à ce démantèlement, l'analyse des différents genres se poursuit et des précisions furent apportées, grâce notamment aux analyses basées sur la comparaison de séquences constitutives des ARN 16S qui sont de petits fragments d'ARN présents dans les ribosomes des cellules (De Vos *et al.*, 1989). Aujourd'hui, la comparaison des séquences d'ARNr (ARN des ribosomes) est généralement admise comme une méthode pertinente pour attribuer une position taxonomique à une souche bactérienne. Néanmoins, plusieurs auteurs ont décrit un certain nombre de limites à cette approche pour les Pseudomonades suscitant ainsi la recherche d'autres marqueurs et proposant de nouvelles classifications sensiblement différentes. Pour n'en citer que quelques-uns : Ait Tayeb *et al.* (2005) ont publié une vaste étude portant sur 186 souches de référence par la comparaison des séquences du gène *rpoB* (sous-unité beta de l'ARN polymérase). De Vos *et al.* (1998) ont tenté de préciser la phylogénie des *Pseudomonas* en s'appuyant sur la comparaison des séquences *oprI* qui est le gène codant pour la lipoprotéine I constituant de la membrane externe. Christensen *et al.* (1994) se sont appuyés sur la comparaison de 4 régions des ARNS 23S. Bodilis et Barray (2006) proposent une classification basée sur les séquences de gène codant pour la protéine membranaire *oprF*. Enfin il

⁵ Monotriche : pour une bactérie qui ne possède qu'un seul flagelle en général en position polaire.

⁶ Multitriche : la bactérie possède plusieurs flagelles en position polaire.

⁷ Classification phénotypique : basée sur l'observation de la structure, de l'aspect des colonies et du mode de culture des bactéries. Différente de la classification génotypique basée sur le patrimoine génétique de la cellule.

⁸ Coloration de Gram : permet aisément de distinguer deux catégories de bactéries selon les caractéristiques de leur paroi cellulaire.

⁹ Génomovar : regroupe des espèces différenciables phylogénétiquement mais pas phénotypiquement.

faut noter également, l'utilisation de la région non codante située entre les gènes 16S et 23S d'ARNr (Guasp *et al.*, 2000) ou encore sur les séquences des gènes *gyrB* (codant pour la sous-unité β de l'ADN gyrase) et *rpoD* (gène codant pour la sous-unité sigma de l'ARN polymérase) (Yamamoto *et al.*, 2000).

Finalement, seules quelques études de large envergure sont disponibles pour une classification des *Pseudomonades* et ce sont celles présentées par Kersters *et al.* (1996b) et par Anzai *et al.* (2000) qui font actuellement référence.

A2/ Classification des *Pseudomonas* : état des lieux (octobre 2009)

Les *Pseudomonas stricto sensu* appartiennent aujourd'hui à la sous classe γ des *Proteobacteria*, tandis que les « ex *Pseudomonas* » ont été répartis dans les sous classes α des *Proteobacteria* (ex : *Brevundimonas*), β , des *Proteobacteria* (ex : *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Comamonas* ou *Hydrogenophaga*); γ - β des *Proteobacteria* (ex : *Xanthomonas Stenotrophomonas*).

A priori, la délimitation du genre *Pseudomonas* est à peu près aboutie et l'éviction massive d'espèces est terminée pour l'instant, même si la classification des espèces au sein du genre souffre encore de nombreuses ambiguïtés.

Par contre, de nouveaux isolats sont fréquemment candidats au positionnement au sein des *Pseudomonas* enrichissant ainsi le genre d'une dizaine de nouvelles espèces par an environ. Leur assignation au genre repose actuellement sur une approche polyphasique de la taxonomie basée sur la mise en évidence de caractères phénotypiques (Bacilles à coloration de Gram négative, aérobies non fermentaires), sur l'établissement des profils d'acides gras entrant dans la constitution de la cellule et en particulier des membranes, de sidérophores ou de protéines et sur les caractères génotypiques (G + C %, hybridation ADN-ADN et analyse des séquences des ARN 16S).

À l'échelle du laboratoire de contrôle et dans le cadre des analyses de routine, l'assignation d'un isolat au genre *Pseudomonas* repose souvent sur l'utilisation de milieux de culture sélectifs et sur la mise en évidence de caractères phénotypiques tels que la coloration de Gram négative, un test positif de détection de l'oxydase (pourtant tous les *Pseudomonas* ne présentent pas une réaction positive au test oxydase) et une absence de fermentation du glucose. L'identification au niveau de l'espèce se fait couramment par l'utilisation de trousse d'identification commercialisées permettant la lecture simultanée d'un grand nombre de caractères biochimiques liés au métabolisme des bactéries. Malheureusement ce type de galerie qui s'appuie sur la mise en évidence d'une vingtaine de caractères, ne compte que 7 souches (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. oryzihabitans*, *P. putida*, et *P. stutzeri*) dans sa base sur les 150 espèces actuellement répertoriées. À noter néanmoins, la présence de souches apparentées telles que *Burkholderia cepacia*, *B. pseudomallei* ou *Stenotrophomonas maltophilia*.

Le tableau A-I, présente une synthèse de la taxonomie des *Pseudomonades*. Apparaissent en grisé les espèces qui ont subi un repositionnement et en caractères gras leur dénomination en cours.

Si la majorité des espèces sont peu ou pas décrites, certaines font l'objet d'une attention renforcée depuis plusieurs décennies. Pour n'en citer que quelques-unes, il s'agit de :

- *Pseudomonas aeruginosa*, agent d'infections nosocomiales dont les mécanismes de virulence font l'objet de nombreux travaux,
- *Pseudomonas syringae*, décliné en plus de 50 pathovars en fonction de sa pathogénicité vis-à-vis des végétaux,
- *Pseudomonas fluorescens* utilisé en tant qu'agent de lutte biologique ou biofertilisant,
- *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas stutzeri* pour leurs aptitudes à la dégradation de nombreux polluants organiques et minéraux et donc particulièrement prometteurs dans le domaine de la bioremédiation.

Tableau A-I : Taxonomie des Pseudomonades

Ancien positionnement taxonomique	Nouveau positionnement taxonomique	Références
<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	(Mohn, Wilson <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	(den Dooren de Jong, 1926) * (Wen, Fegan <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas abikonensis</i>	<i>Sphingomonas</i> rRNA lineage	(Anzai, Kim <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Young 1970)
<i>Pseudomonas agarici</i>	<i>Pseudomonas agarici</i>	(Young 1970)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	(Monias 1928)
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	(Yumoto, Kusano <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas aminovorans</i>	<i>Aminobacter aminovorans</i>	(den Dooren de Jong, 1926) * (Kampfer, Neef <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas amygdali</i>	Synonymes: <i>Pseudomonas ficuserectae</i> , <i>Pseudomonas meliae</i> <i>Pseudomonas savastanoi</i>	(Psallidas et Panagopoulos 1975)
<i>Pseudomonas andropogonis</i>	<i>Burkholderia andropogonis</i>	(Smith et Stapp 1911) (Gillis, Van Van <i>et al.</i> 1995)
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	(Wakabayashi et Egusa 1972)
<i>Pseudomonas antarctica</i>	<i>Pseudomonas antarctica</i>	(Reddy, Matsumoto <i>et al.</i> 2004)
<i>Pseudomonas antimicrobica</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	(Severini, 1913) * (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas aptata</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	(Peix, Berge <i>et al.</i> 2005)
<i>Pseudomonas asplenii</i>	<i>Pseudomonas asplenii</i>	(Ark et Tompkins, 1946) * (Savulescu 1947)
<i>Pseudomonas atrofaciens</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>Aurantiaca</i>	(Nakhimovskaya, 1948) * (Peix, Valverde <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>	(Kluyver 1956) (Peix, Valverde <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas avellanae</i>	<i>Pseudomonas avellanae</i>	(Janse, Derks <i>et al.</i> 1997)
<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i> .	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avena</i>	(Manns, 1909) * (Willems, Goor <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	<i>Acidovorax citrulli</i>	(Schaad, Sowell Jr <i>et al.</i> 1978) (Schaad, Postnikova <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>konjaci</i>	<i>Acidovorax konjaci</i>	(Goto 1983) (Willems, Goor <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>Cattleyae</i>	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>Cattleyae</i>	(Manns ,1909) * (Willems, Goor <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas azelaica</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	(Iizuka et Komagata 1964) (Lang, Griese <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas azotifigens</i>	<i>Pseudomonas azotifigens</i>	(Hatayama, Kawai <i>et al.</i> 2005)
<i>Pseudomonas azotocolligans</i>	<i>Sphingomonas trueperi</i>	(Kampfer, Denner <i>et al.</i> 1997)

<i>Pseudomonas azotoformans</i>	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	(Iizuka et Komagata 1963)
<i>Pseudomonas balearica</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Bennasar, Rossello-Mora <i>et al.</i> 1996)
<i>Pseudomonas bathycetes</i>	<i>Halomonas sp.</i>	
<i>Pseudomonas beijerinckii</i>	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i>	(Hof, 1935)* (Peconek, Gruber <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas beteli</i>	<i>Xanthomonas beteli</i> , <i>Stenotrophomonas ?</i>	(Ragunathan, 1928) * (Savulescu 1947)
<i>Pseudomonas borbori</i>	<i>Pseudomonas borbori</i>	(Vanparys, Heylen <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas boreopolis</i>	<i>Xanthomonas</i>	(Gray et Thornton 1928) (Anzai, Kim <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	(Achouak, Sutra <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas brenneri</i>	<i>Pseudomonas brenneri</i>	(Baïda, Yazourh <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas butanovora</i>	<i>Thauera</i> rRNA lineage	(Anzai, Kim <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Pseudomonas cannabina</i>	(Sutic et Dowson 1959) (Gardan, Shafik <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	(Auling, Reh <i>et al.</i> 1978) (Willems, Busse <i>et al.</i> 1989)
<i>Pseudomonas carboxydohydrogena</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	(Sanzhieva et Zavarzin 1971) (Meyer, Lalucat <i>et al.</i> 1980)
<i>Pseudomonas carboxydovorans</i>	<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	(Meyer et Schlegel 1978) (Meyer 1993)
<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	(Robbs 1956)
<i>Pseudomonas caryophylli</i>	<i>Burkholderia caryophylli</i>	(Burkholder, 1942) * (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas cattleyae</i>	<i>Acidovorax cattleyae</i>	(Pavarino, 1911) * (Schaad, Postnikova <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas cedrina</i>	<i>Pseudomonas cedrina</i>	(Dabboussi, Hamze <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	(Palleroni et Holmes 1981) (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas chloritidismutans.</i>	Synonyme <i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Wolterink, Jonker <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Maintenant subdivisé en 3 sous espèces: <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> subsp. nov., <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> subsp. nov., comb. nov. <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	(Guignard et Sauvageau, 1894) * (Peix, Valverde <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	(Swingle, 1925) * (Stapp 1928)
<i>Pseudomonas cissicola</i>	<i>Xanthomonas cissicola</i>	(Takimoto, 1939) * (Hu, Young <i>et al.</i> 1997)

<i>Pseudomonas citronellolis</i>	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	(Seubert 1960)
<i>Pseudomonas cocovenenans</i>	<i>Burkholderia cocovenerans</i> <i>Burkholderia gladioli</i>	(Van Damme, Johannes <i>et al.</i> 1960) (Gillis, Van Van <i>et al.</i> 1995) (Severini, 1913) * (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas compransoris</i>	<i>Zavarzinia compransoris</i>	(Nozhevnikova et Zavarzin 1974) (Meyer 1993)
<i>Pseudomonas congelans</i>	<i>Pseudomonas congelans</i>	(Behrendt, Ulrich <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas coronafaciens</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(van Hall, 1902) *
<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i> puis <i>Pseudomonas mediterranea</i>	(Catara, Sutra <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas costantinii</i>	<i>Pseudomonas costantinii</i>	(Munsch, Alatossava <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	(Uchino, Shida <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas cuatrocienegasensis</i>	<i>Pseudomonas cuatrocienegasensis</i>	(Escalante, Caballero-Mellado <i>et al.</i> 2009)
<i>Pseudomonas dacunhae</i>	<i>Pseudomonas testosteroni</i> <i>Comamonas testosteroni</i>	(Marcus et Talalay 1956) (Tamaoka, Ha <i>et al.</i> 1987)
<i>Pseudomonas delafieldii</i>	<i>Acidovorax delafieldii</i>	(Davis, Stanier <i>et al.</i> 1970) (Willems, Falsen <i>et al.</i> 1990)
<i>Pseudomonas delphinii</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Manceau et Horvais 1997)
<i>Pseudomonas delhiensis</i>	<i>Pseudomonas delhiensis</i>	(Prakash, Kumari <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas desmolytica</i>	<i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Delftia acidovorans</i>	(den Dooren de Jong, 1926)* (Wen, Fegan <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas diminuta</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	(Leifson et Hugh 1954) (Segers, Vancanneyt <i>et al.</i> 1994)
<i>Pseudomonas doudoroffii</i>	<i>Oceanimonas doudoroffii</i>	(Baumann, Baumann <i>et al.</i> 1972) (Brown, Sutcliffe <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas duriflava</i>	<i>Pseudomonas duriflava</i>	(Liu, Liu <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas echinoides</i>	<i>Sphingomonas echinoides</i>	(Heumann 1962) (Denner, Kampfner <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas elongata</i>	<i>Microbulbifer elongatus</i>	(Humm, 1946)* (Yoon, Kim <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas extorquens</i> ' et ' <i>Pseudomonas rosea</i> '	<i>Methylobacterium extorquens</i>	(Kerstens, Ludwig <i>et al.</i> 1996)
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	(Ivanova, Gorshkova <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas facilis</i>	<i>Acidovorax facilis</i>	(Shatz et Howell 1952) (Willems, Falsen <i>et al.</i> 1990)
<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	(Goto 1983)
<i>Pseudomonas flava</i>	<i>Hydrogenophaga flava</i>	(Niklewski, 1910) * (Willems, Busse <i>et al.</i> 1989)
<i>Pseudomonas flavescens</i>	<i>Pseudomonas flavescens</i>	(Hildebrand, Palleroni <i>et al.</i> 1994)
<i>Pseudomonas flectens</i>	? exclu <i>Pseudomonas</i>	(Johnson 1956) (Anzai, Kim <i>et al.</i> 2000)

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Migula, 1895)*
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	(Eichholz, 1902)* (Gruber, 1905) *
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	(Andersen, Johnsen <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas fulva</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>	(Iizuka et Komagata 1963)
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	(Tanii, Miyajima <i>et al.</i> 1976) (Miyajima, Tanii <i>et al.</i> 1983)
<i>Pseudomonas gelidicola</i>	<i>Pseudomonas gelidicola</i>	(Kadota 1951)
<i>Pseudomonas geniculata</i>	? exclu <i>Pseudomonas</i>	(Wright, 1895) * (Chester, 1901) * (Anzai, Kim <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	<i>Pseudomonas gessardii</i>	(Verhille, Baida <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas gladioli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	(Severini, 1913)* (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas glathei</i>	<i>Burkholderia glathei</i>	(Zolg et Ottow 1975) (Vandamme, Holmes <i>et al.</i> 1997)
<i>Pseudomonas glumae</i>	<i>Burkholderia glumae</i>	(Kurita et Tabei 1967) (Urakami, Ito-Yoshida <i>et al.</i> 1994)
<i>Pseudomonas graminis</i>	<i>Pseudomonas graminis</i>	(Behrendt, Ulrich <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas grimontii</i>	<i>Pseudomonas grimontii</i>	(Baida, Yazourh <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas guineae</i>	<i>Pseudomonas guineae</i>	(Bozal, Montes <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas halodurans</i>	<i>Halomonas halodurans</i>	(Hebert et Vreeland 1987)
<i>Pseudomonas halophila</i>	<i>Halomonas halophila</i> ou <i>Halovibrio variabilis</i>	(Fendrich 1989) (Sorokin et Tindall 2006)
<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	? exclu <i>Pseudomonas</i>	(Moniz 1963) (Anzai, Kim <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas huttiensis</i>	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	(Leifson 1962) (Ding et Yokota 2004)
<i>Pseudomonas indica</i>	<i>Pseudomonas indica</i>	(Pandey, Mayilraj <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas indigofera</i>	<i>Vogesella indigofera</i>	(Voges, 1893) * (Grimes, Woese <i>et al.</i> 1997)
<i>Pseudomonas iners</i>	<i>Marinobacterium georgiense</i>	(Gonzalez, Mayer <i>et al.</i> 1997) (Satomi, Kimura <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas iodinum</i>	<i>Brevibacterium iodinum</i>	(Davis, 1939) * (Collins, Jones <i>et al.</i> 1980)
<i>Pseudomonas japonica</i>	<i>Pseudomonas japonica</i>	(Pungrasmi, Lee <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas jessenii</i>	<i>Pseudomonas jessenii</i>	(Verhille, Baida <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	(Kwon, Kim <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	(Sikorski, Stackebrandt <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas knackmussii</i>	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	(Stolz, Busse <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	(Kwon, Kim <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas lacrymans</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Manceau et Horvais 1997)
<i>Pseudomonas lanceolata</i>	<i>Curvibacter lanceolatus</i>	(Leifson 1962)

		(Ding et Yokota 2004)
<i>Pseudomonas lapsa</i>	<i>Pseudomonas syringae pv lapsa</i>	(Van Hall, 1902) * (Ark, 1940) * (Young, Dye <i>et al.</i> 1978)
<i>Pseudomonas lemoignei</i>	<i>Paucimonas lemoignei</i>	(Delafield, Cooksey <i>et al.</i> 1965) (Jendrossek 2001)
<i>Pseudomonas libanensis</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	(Dabboussi, Hamze <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas lini</i>	<i>Pseudomonas lini</i>	(Delorme, Lemanceau <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas lundensis</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	(Molin, Ternstrom <i>et al.</i> 1986)
<i>Pseudomonas lurida</i>	<i>Pseudomonas lurida</i>	(Behrendt, Ulrich <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas lutea</i>	<i>Pseudomonas lutea</i>	(Peix, Rivas <i>et al.</i> 2004)
<i>Pseudomonas luteola</i>	Synonyme <i>Chryseomonas luteola</i>	(Kodama, Kimura <i>et al.</i> 1985)
<i>Pseudomonas mallei</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	(Zopf, 1885) * (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	(Hugh 1981) (Swings, De Vos <i>et al.</i> 1983) (Van den Mooter et Swings 1990) (Hugh 1981) (Palleroni et Bradbury 1993)
<i>Pseudomonas mandelii</i>	<i>Pseudomonas mandelii</i>	(Verhille, Baida <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	(Brown, 1918) * (Skerman, McGowan <i>et al.</i> 1980)
<i>Pseudomonas marginata</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	(Severini, 1913) * (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas marina</i>	<i>Deleya marina</i> <i>Halomonas marina</i> <i>Cobetia marina</i>	(Cobet, Wirsén <i>et al.</i> 1970) (Baumann, Bowditch <i>et al.</i> 1983) (Cobet, Wirsén <i>et al.</i> 1970) (Dobson et Franzmann 1996) (Cobet, Wirsén <i>et al.</i> 1970) (Arahal, Castillo <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas marincola</i>	<i>Pseudomonas marincola</i>	(Romanenko, Uchino <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	(Catara, Sutra <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas meliae</i>	<i>Pseudomonas meliae</i>	(Ogimi 1981)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	(Palleroni, Doudoroff <i>et al.</i> 1970)
<i>Pseudomonas mephitica</i>	<i>Janthinobacterium lividu</i>	(Eisenberg, 1891)* (De Ley, Segers <i>et al.</i> 1978) (Kampfer, Falsen <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas meridiana</i>	<i>Pseudomonas meridiana</i>	(Reddy, Matsumoto <i>et al.</i> 2004)
<i>Pseudomonas mesophilica</i>	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	(Austin et Goodfellow 1979) (Green et Bousfield 1983)
<i>Pseudomonas migulae</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	(Verhille, Baida <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas mixta</i>	<i>Telluria mixta</i>	(Bowman, Sly <i>et al.</i> 1988) (Bowman, Sly <i>et al.</i> 1993)
<i>Pseudomonas mohnii</i>	<i>Pseudomonas mohnii</i>	(Camara, Strompl <i>et al.</i> 2007)

<i>Pseudomonas monteillii</i>	<i>Pseudomonas monteillii</i>	(Elomari, Coroler <i>et al.</i> 1997)
<i>Pseudomonas moorei</i>	<i>Pseudomonas moorei</i>	(Camara, Strompl <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas moraviensis / asplenii</i>	<i>Pseudomonas moraviensis / asplenii</i>	(Tvrzova, Schumann <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas morsprunorum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Manceau et Horvais 1997)
<i>Pseudomonas mosselii</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	(Dabboussi, Hamze <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	(Levine et Anderson 1932)
<i>Pseudomonas multiresinivorans</i>	Synonyme <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	(Mohn, Wilson <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas natriegens</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	(Payne, Eagon <i>et al.</i> 1961) (Baumann, Baumann <i>et al.</i> 1980)
<i>Pseudomonas nautica</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	(Baumann, Baumann <i>et al.</i> 1972) (Gauthier, Lafay <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas nigrifaciens</i>	<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	(Baumann, Baumann <i>et al.</i> 1984) (Gauthier, Gauthier <i>et al.</i> 1995)
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	(Iizuka et Komagata 1964)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	(Lee et Chandler 1941)
<i>Pseudomonas orientalis</i>	<i>Pseudomonas orientalis</i>	(Dabboussi, Hamze <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas oryzae</i>	Synonyme <i>Flavimonas oryzae</i>	(Kodama, Kimura <i>et al.</i> 1985) (Anzai, Kudo <i>et al.</i> 1997)
<i>Pseudomonas otitidis</i>	<i>Pseudomonas otitidis</i>	(Clark, Dajcs <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas ovalis</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	(Migula, 1895) * (Dubinina et Zhdanov 1975)
<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	(Romanenko, Uchino <i>et al.</i> 2005)
<i>Pseudomonas palleroniana</i>	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	(Gardan, Bella <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas palleronii</i>	<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	(Davis, Stanier <i>et al.</i> 1970) (Willems, Busse <i>et al.</i> 1989)
<i>Pseudomonas panacis</i>	<i>Pseudomonas panacis</i>	(Park, Lee <i>et al.</i> 2005)
<i>Pseudomonas panipatensis</i>	<i>Pseudomonas panipatensis</i>	(Gupta, Kumari <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas parafulva</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>	(Uchino, Shida <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	(Holmes, Owen <i>et al.</i> 1977) (Yabuuchi, Yano <i>et al.</i> 1990)
<i>Pseudomonas pelagia</i>	<i>Pseudomonas pelagia</i>	(Hwang, Zhang <i>et al.</i> 2009)
<i>Pseudomonas peli</i>	<i>Pseudomonas peli</i>	(Vanparys, Heylen <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas perfectomarina.</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(ZoBell et Upham, 1944) * (Baumann, Bowditch <i>et al.</i> 1983)
<i>Pseudomonas pertucinogena</i>	Anciennement <i>Bordetella pertussis</i>	(Kawai et Yabuuchi 1975)
<i>Pseudomonas phaseolicola</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Manceau et Horvais 1997)
<i>Pseudomonas phenazinium</i>	<i>Burkholderia phenazinium</i>	(Bell et Turner 1973) (Viallard, Poirier <i>et al.</i> 1998)
<i>Pseudomonas pickettii</i>	<i>Burkholderia pickettii</i> <i>Ralstonia pickettii</i>	(Ralston, Palleroni <i>et al.</i> 1973) (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1995)
<i>Pseudomonas pictorum</i>	? exclu <i>Pseudomonas</i>	(Gray et Thornton 1928)

		(Anzai, Kim <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas piscicida</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	(Hansen, Weeks <i>et al.</i> 1965) (Gauthier, Gauthier <i>et al.</i> 1995)
<i>Pseudomonas pisi</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Manceau et Horvais 1997)
<i>Pseudomonas plantarii</i>	<i>Burkholderia plantarii</i>	(Azegami, Nishiyama <i>et al.</i> 1987) (Urakami, Ito-Yoshida <i>et al.</i> 1994)
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	(Nishimori, Kita-Tsukamoto <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas poae</i>	<i>Pseudomonas poae</i>	(Behrendt, Ulrich <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas pohangensis</i>	<i>Pseudomonas pohangensis</i>	(Weon, Kim <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas proteolytica</i>	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	(Reddy, Matsumoto <i>et al.</i> 2004)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	(Stanier, Palleroni <i>et al.</i> 1966)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. Citrulli</i>	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>Citrulli</i> <i>Acidovorax citrulli</i>	(Schaad, Sowell Jr <i>et al.</i> 1978) (Hu, Young <i>et al.</i> 1991) (Schaad, Sowell Jr <i>et al.</i> 1978) (Schaad, Postnikova <i>et al.</i> 2008)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. konjaci</i>	<i>Acidovorax konjaci</i>	(Goto 1983) (Willems, Goor <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	(Auling, Reh <i>et al.</i> 1978) (Willems, Busse <i>et al.</i> 1989)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	(Whitmore, 1913) * (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	(Yumoto, Kusano <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	(Hauser, Kampfer <i>et al.</i> 2004)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	(Trevisan, 1889) * (Migula, 1895) *
<i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	(Imanaka, Kousaka <i>et al.</i> 1965) (Vandamme, Holmes <i>et al.</i> 1997)
<i>Pseudomonas radiora</i>	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	(Ito et Iizuka 1971) (Green et Bousfield 1983)
<i>Pseudomonas reinekei</i>	<i>Pseudomonas reinekei</i>	(Camara, Strompl <i>et al.</i> 2007)
<i>Pseudomonas reptilivora</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	(Marcus et Talalay 1956) (Tamaoka, Ha <i>et al.</i> 1987)
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	(Delaporte, Raynaud <i>et al.</i> 1961)
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	(Peix, Rivas <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	(Coroler, Elomari <i>et al.</i> 1996)
<i>Pseudomonas rhodos</i>	<i>Methylobacterium rhodinum</i>	(Heumann 1962) (Green et Bousfield 1983)
<i>Pseudomonas riboflavina</i>	<i>Devosia riboflavina</i>	(Foster, 1944) * (Nakagawa, Sakane <i>et al.</i> 1996)
<i>Pseudomonas rubrilineans</i>	<i>Pseudomonas avenae</i>	(Lee <i>et al.</i> , 1925) *

	<i>Acidovorax avenae</i>	(Manns, 1909) * (Willems, Goor <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i>	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	(Christopher et Edgerton, 1930) * (Baldani, Pot <i>et al.</i> 1996)
<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	<i>Pseudomonas sabulinigri</i>	(Kim, Roh <i>et al.</i> 2009)
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	<i>Pelomonas saccharophila</i>	(Doudoroff ,1940) * (Xie et Yokota 2005)
<i>Pseudomonas salomonii</i>	<i>Pseudomonas salomonii</i>	(Gardan, Bella <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	(Janse 1982) (Gardan, Bollet <i>et al.</i> 1992)
<i>Pseudomonas segetis</i>	<i>Pseudomonas segetis</i>	(Park, Yi <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas simiae</i>	<i>Pseudomonas simiae</i>	(Vela, Gutierrez <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	<i>Burkholderia solanacearum</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>	(Smith, 1896) * (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1992) (Yabuuchi, Kosako <i>et al.</i> 1995)
<i>Pseudomonas spinosa</i>	<i>Malikia spinosa</i>	(Leifson 1962) (Spring, Wagner <i>et al.</i> 2005)
<i>Pseudomonas stanieri</i>	<i>Marinobacterium stanieri</i>	(Baumann, Bowditch <i>et al.</i> 1983) (Satomi, Kimura <i>et al.</i> 2002)
<i>Pseudomonas straminea</i>	<i>Pseudomonas straminea</i>	(Iizuka et Komagata 1963)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Lehmann et Neumann, 1896) * (Sijderius, 1946) *
<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	(Ehrenberg, 1840) * (Holland, 1920) *
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	(Van Hall, 1902) *
<i>Pseudomonas syzygii</i>	<i>Ralstonia syzygii</i>	(Roberts, Eden-Green <i>et al.</i> 1990) (Vanechoutte, Kampf <i>et al.</i> 2004)
<i>Pseudomonas taeniospiralis</i>	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	(Lalucat, Pares <i>et al.</i> 1982) (Willems, Busse <i>et al.</i> 1989)
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	(Haynes et Burkholder 1957)
<i>Pseudomonas terrigena</i>	<i>Comamonas terrigena</i>	(Davis et Park 1962) (De Vos, Kersters <i>et al.</i> 1985) (Willems, Pot <i>et al.</i> 1991)
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	(Marcus et Talalay 1956) (Tamaoka, Ha <i>et al.</i> 1987)
<i>Pseudomonas thermocarboxydovorans</i>	<i>Non Pseudomonas, non classifié</i>	(Lyons, Justin <i>et al.</i> 1984)
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	(Manaia et Moore 2002)
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	(Achouak, Sutra <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	(Paine, 1919) *
<i>Pseudomonas tremae</i>	<i>Pseudomonas tremae</i>	(Gardan, Shafik <i>et al.</i> 1999)
<i>Pseudomonas trivialis</i>	<i>Pseudomonas trivialis</i>	(Behrendt, Ulrich <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas tuomuerensis</i>	<i>Pseudomonas tuomuerensis</i>	(Xin, Zhang <i>et al.</i> 2009)
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	(Kwon, Kim <i>et al.</i> 2003)
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	(Mohn, Wilson <i>et al.</i> 1999)

<i>Pseudomonas veronii</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	(Elomari, Coroler <i>et al.</i> 1996)
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	(Busing, Doll <i>et al.</i> 1953) (Segers, Vancanneyt <i>et al.</i> 1994)
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	(Burkholder, 1930) * (Dowson, 1939) *
<i>Pseudomonas viscogena</i>	Exclu <i>Pseudomonas</i> mais non reclassé	
<i>Pseudomonas vranovensis</i>	<i>Pseudomonas vranovensis</i>	(Tvrzova, Schumann <i>et al.</i> 2006)
<i>Pseudomonas woodsii</i>	<i>Burkholderia andropogonis</i>	(Smith et Stapp 1911) (Gillis, Van Van <i>et al.</i> 1995) (Coenye, Laevens <i>et al.</i> 2001)
<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	(Romanenko, Uchino <i>et al.</i> 2005b)
<i>Pseudomonas xiamenensis</i>	<i>Pseudomonas xiamenensis</i>	(Lai et Shao 2008)
<i>Pseudomonas xinjiangensis</i>	<i>Pseudomonas xinjiangensis</i>	(Liu, Luo <i>et al.</i> 2009)

*: Pour ces articles les références ne sont pas disponibles

ANNEXE B

Caractéristiques des *Pseudomonas* (Garrity, 2005)

Le genre des *Pseudomonas* renferme des bacilles à coloration de Gram négative, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 1,5 à 5,0 μm (ou plus) de longueur, non sporulés, le plus souvent dépourvus de granules de poly-bêta-hydroxybutyrate (quelques souches de *P. pseudoalcaligenes* et *P. corrugata* accumulent de l'acide poly-bêta-hydroxybutyrique comme matériel de réserve en fin de croissance exponentielle). Ces bactéries sont très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires mais certaines espèces telles que *P. mendocina* ou *P. stutzeri* présentent également des flagelles latéraux dans certaines conditions de culture.

Dans leur grande majorité, ces bactéries produisent des sidérophores (pyocyanine, pyorubine, chlororaphine, oxyphénazine), macromolécules chélatrices des ions ferriques qui sont synthétisées en réponse à une carence en fer du milieu de culture. Certaines de ces molécules sont souvent considérées comme caractéristiques d'espèces telles la pyocyanine, pigment vert-bleu de *P. aeruginosa*, la chlororaphine verte de *P. chlororaphis* ou la phenazine-monocarboxilique caractéristique de *P. aureofaciens*. Les *Pseudomonas* producteurs de pigments sont fréquemment appelés *Pseudomonas* fluorescents et le genre *Pseudomonas* a longtemps été restreint à ce groupe bien que de nombreux *Pseudomonas* soient maintenant décrits pour leur absence de production de pigment fluorescent. Les plus connus d'entre eux sont: *P. alcaligenes*, *P. corrugata*, *P. fragi*, *P. frederiksbergensis*, *P. graminis*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. oryzihabitans*, *P. otitidis*, *P. plecoglossicida*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*. Il faut également préciser que certaines espèces telles que *P. stutzeri*, bien que dépourvues de pigment, forment des colonies qui deviennent marron foncé au cours de leur vieillissement par l'accumulation de cytochrome c oxydase dans les cellules.

Ces bactéries sont aérobies, à métabolisme strictement respiratoire. Toutefois certaines espèces sont capables de se multiplier en conditions anaérobies par utilisation des nitrates comme accepteur final d'électrons ou par hydrolyse de l'arginine *via* le système dit de l'arginine dihydrolase. Dans leur grande majorité, les bactéries de ce groupe sont chimio-organotrophes, catalase positive, oxydase variable, non indologènes et ne produisent pas d'acétoïne. La gamme de croissance de ces micro-organismes est étendue puisque certains *Pseudomonas* peuvent être considérés comme psychrotrophes avec une température minimale de croissance voisine de 3°, d'autres comme thermophiles modérés avec une température maximum voisine de 45°C. Globalement, tous sont capables de se multiplier à 28°C et pour des valeurs de pH supérieures à 4,5. Mais finalement leur caractéristique majeure reste la diversité et la pluralité des substrats carbonés qu'ils sont capables d'utiliser et leur richesse en enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, estérases, etc.).

Les flores apparentées aux *Pseudomonas* (*Bcc*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*...) possèdent des caractéristiques phénotypiques proches de celles décrites ci-dessus.

ANNEXE C

Éléments d'interprétation des données extraites de la base SISE-Eaux

Des informations relatives à la qualité des eaux distribuées en France ont été extraites de la base nationale de données SISE-Eaux (Système d'Information en Santé-Environnement sur les Eaux) du ministère chargé de la santé. Cette base rassemble les données du contrôle sanitaire des eaux d'alimentation.

Bien que *Pseudomonas* ne soit pas un paramètre du contrôle sanitaire des eaux, des résultats d'analyses sont disponibles dans cette base et les résultats issus des prélèvements réalisés entre le 01/01/1990 et le 30/09/2009 au point de captage de l'eau brute (CAP), à la sortie de la station de traitement de l'eau potable (TTP) ou au niveau du réseau de distribution (UDI) en ont été extraits. Les analyses ont été effectuées lors du contrôle sanitaire (CS), des re-contrôles de l'eau distribuée (S1) ou de l'eau brute (S2) en cas de non conformité ou à l'occasion de contrôles supplémentaires mis en place en cas de signes de dégradation de la qualité de l'eau (S3).

Aucun résultat n'était renseigné pour *Pseudomonas* entre 1990 et 1996. Par conséquent, les données disponibles couvrent la période de 1996 à 2009. De plus, en 1996 les 12 résultats disponibles qui concernent tous un seul site et sont tous positifs ont été supprimés car considérés clairement aberrants au regard des autres résultats.

Ces données ont été utilisées pour apprécier la prévalence et la concentration de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* Toutefois, pour ces paramètres, les données renseignées dans cette base ne peuvent prétendre à une représentativité nationale (spatiale et temporelle notamment).

L'extraction des résultats a été demandée pour 3 paramètres :

- *Pseudomonas aeruginosa* dans 250 mL (**PSA 250**),
- *Pseudomonas aeruginosa* dans 100 mL (**PSA100**),
- *Pseudomonas spp.* (**PSMSPP**).

D'autres paramètres se rapportant aux Pseudomonades sont renseignés dans la base (exemple *P. putida*) mais le nombre de données associées à ces paramètres est très limité (de zéro à quelques résultats positifs).

P. aeruginosa et *Pseudomonas spp.*, ont été recherchés dans 6023 prélèvements (respectivement 4220 et 1803 échantillons).

Il est à noter que les prévalences et les dénombrements présentés ci-après et dénommés « *Pseudomonas spp.* » correspondent aux espèces bactériennes de *Pseudomonas* (et d'autres groupes) qui cultivent sur les milieux gélosés employés et à la température d'incubation utilisée. Toutes les espèces de *Pseudomonas* ne cultivent pas sur ces milieux. « *Pseudomonas spp.* » constitue uniquement un indicateur de la présence de Pseudomonades.

Pour chaque prélèvement associé à un résultat quantifié ou non en *Pseudomonas*, les paramètres suivants ont été renseignés lorsqu'ils étaient disponibles :

- Chlore libre (**CL2LIB**)
- Chlore total (**CL2TOT**)
- Bactéries aérobies revivifiables à 22°C -68h (**GT22_68**)
- Bactéries aérobies revivifiables à 22°C -72h (**GT22**)
- Bactéries aérobies revivifiables à 36°C -44h (**GT36_44**)

- Bactéries aérobies revivifiables à 37°C -24h (GT37)

L'exploitation des résultats de l'extraction a été effectuée par l'unité d'appréciation quantitative du risque et épidémiologie en microbiologie et santé animale de l'Anses. Le traitement des données repose sur l'analyse des quantiles des dénombrements de *Pseudomonas* :

- représentés graphiquement sous forme de distributions cumulatives. Les distributions cumulatives indiquent la proportion d'échantillons où *Pseudomonas* a été détecté et la répartition des concentrations de *Pseudomonas* ;
- ou synthétisés dans les tableaux présentant la prévalence, la moyenne, les valeurs minimales et maximales, la médiane, les 10^{ème}, 25^{ème}, 75^{ème} et 90^{ème} percentiles et l'écart type accompagnées de tests statistiques pour vérifier des différences entre les prévalences ou les concentrations. Le nombre de données a été jugé insuffisant pour caractériser les quantiles lorsque moins de 5 résultats quantifiés étaient disponibles.

C1/ Distribution des concentrations de *P. aeruginosa* en fonction du volume de l'échantillon

Pour *P. aeruginosa*, les analyses ont été effectuées sur des échantillons de 100 mL (3300 échantillons) ou de 250 mL (932 échantillons). Les résultats de dénombrement obtenus avec les deux méthodes (volume de l'échantillon filtré différent) ont été comparés. À ce titre, il est à noter que :

- les proportions des différents types d'eaux analysées (CAP, UDI et TTP), sont similaires pour les deux méthodes d'analyse avec une majorité d'UDI ;
- la majorité des résultats concerne le contrôle sanitaire (près de 97% des analyses).

Il est donc raisonnable de comparer les résultats des deux méthodes.

La Figure C-1 présente la distribution cumulative des dénombrements de *P. aeruginosa* en fonction du volume d'eau analysé (100 ou 250 mL).

Plus de 90% des échantillons ne présentent pas de concentration quantifiable de *P. aeruginosa*. La représentation graphique des distributions cumulée se limite donc à la portion de distribution cumulative comprise entre 90% et 100% (axe des ordonnées).

Pour des volumes d'eau de 100 et 250 mL, le pourcentage d'échantillons positifs est respectivement de 4% et 9%. L'analyse de 250 mL, grâce à un seuil de détection plus bas, permet une détection plus fréquente de *P. aeruginosa*.

En conclusion, les résultats pour *P. aeruginosa* peuvent être regroupés quand on s'intéresse aux distributions cumulatives. En revanche, en examinant les moyennes (ou écarts types) des eaux dans lesquelles ils ont été dénombrés, il est alors nécessaire de considérer séparément les deux types d'analyses. C'est cette règle qui sera suivie dans les éléments de réponse présentés.

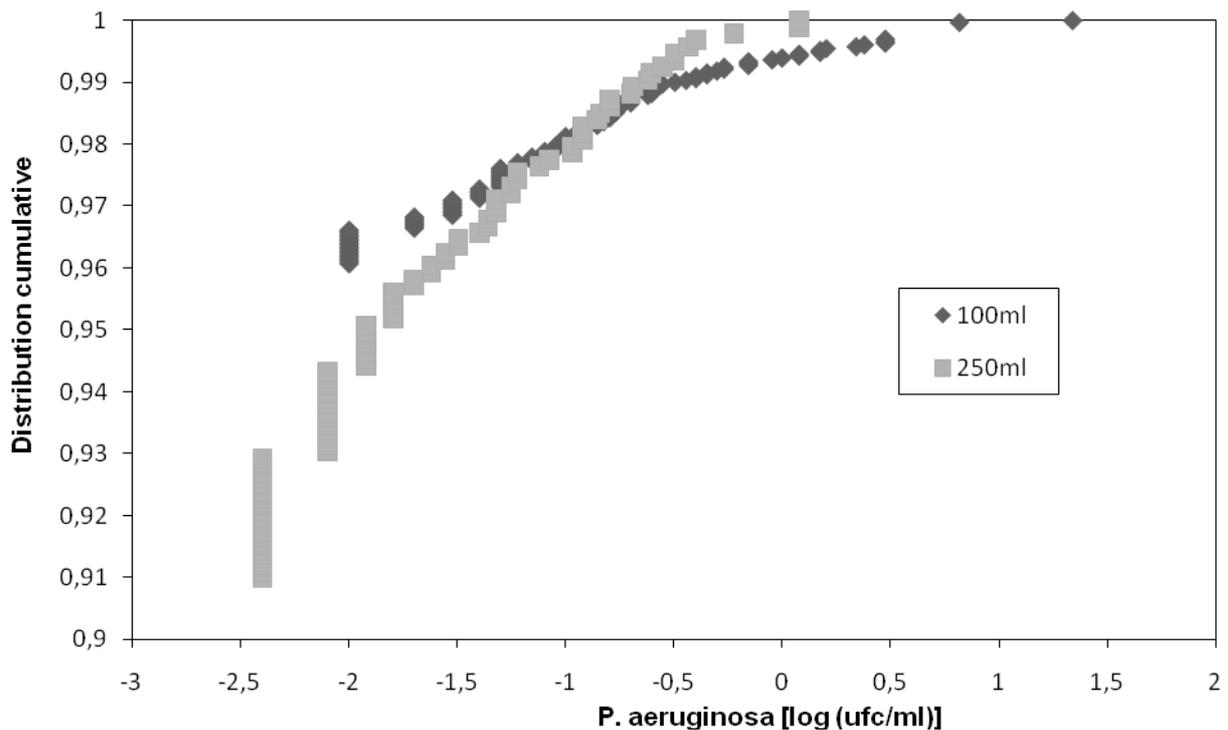


Figure C-1. Distribution cumulative des dénombrements de *P. aeruginosa* en fonction du volume d'eau analysé (100 ou 250 mL)

C2/ Influence du type d'eau analysée (CAP, TTP, UDI) sur les fréquences de détection et les concentrations de *Pseudomonas* (re-contrôle et adductions privées exclus)

Pour comparer les fréquences de détection de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* en fonction du type d'eau (CAP, TTP, UDI), seuls les résultats du contrôle sanitaire (CS) sont pris en compte, les re-contrôles (S) sont donc exclus. Parmi les résultats du CS, seuls ceux effectués sur les adductions d'eau publique (AEP) sont étudiés, à l'exclusion des adductions privées (PRV).

Le tableau C-I donne les statistiques concernant les prévalences et les concentrations de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* selon le type d'eau analysé (CAP, TTP, UDI).

Il est à noter que :

- la prévalence de *P. aeruginosa* dans les TTP pour les échantillons de 250 mL n'a pas été incluse dans le traitement statistique car la majorité des données pour cette catégorie provient d'un seul site de station de potabilisation. Une comparaison pour cette catégorie relèverait donc plus d'une différence entre sites que d'une différence avec UDI ou CAP.
- les données sur les captages (CAP) sont peu nombreuses (78 échantillons hors adductions privées et re-contrôles pour *P. aeruginosa* et aucun pour *Pseudomonas spp.*) et ne permettent pas une comparaison entre les concentrations de *P. aeruginosa* dans les CAP et dans les UDI ou les TTP.

Pour *Pseudomonas spp.* et *P. aeruginosa* dans 100 mL les concentrations et prévalences dans les UDI et les TTP ne sont pas significativement différentes.

Tableau C-I. Statistiques concernant la prévalence et les concentrations de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* en fonction du type d'eau analysée (TTP, UDI ou CAP)

Volume (mL)		<i>P. aeruginosa</i>						<i>Pseudomonas spp.</i>		
		250			100			CAP	TTP	UDI
Type d'installation		CAP	TTP	UDI	CAP	TTP	UDI	CAP	TTP	UDI
Données relative à la prévalence	Nombre total	48	-	541	30	386	2085	-	351	1153
	Positif	1	-	37	2	12	65	-	20	47
	Prévalence <i>P</i> (%)	2,1	-	6,8	6,7	3,1	3,2	-	5,7	4,1
	IC de <i>P</i> (à 95%)	[0,4 - 10,9]	-	[5,0 - 9,3]	[2,0 - 19,3]	[1,4 - 4,8]	[2,5 - 4,0]	-	[3,7 - 8,6]	[3,1 - 5,4]
Données relatives aux dénombrements positifs log (ufc/mL)	Minimum	-	-	-2,40	-	-2,00	-2,00	-	-2	-2
	10 ^{ème} perc.	-	-	-2,40	-	-1,52	-2,00	-	-2	-2
	25 ^{ème} perc.	-	-	-2,40	-	-1,30	-1,52	-	-2	-1,22
	Médiane	-	-	-1,80	-	-0,67	-1,07	-	-1,41	-0,82
	75 ^{ème} perc.	-	-	-0,80	-	-0,60	-0,40	-	-0,70	-0,38
	90 ^{ème} perc.	-	-	-0,49	-	-0,40	0,34	-	-0,30	0
	Maximum	-	-	-0,22	-	-0,27	1,34	-	0,18	0,30
	Moyenne	-	-	-1,57	-	-0,89	-0,97	-	-1,27	-0,87
	Écart type	-	-	0,75	-	0,49	0,81	-	0,73	0,61

- données insuffisantes pour caractériser les quantiles

perc. : percentile

IC : intervalle de confiance

C3/ Exploitation des résultats d'analyses effectuées au niveau des UDI

a. Prévalence et concentration des *Pseudomonas* dans les UDI en fonction du type d'adduction d'eau: publique (AEP) ou privée (PRV)

Les adductions d'eau privées (PRV) correspondent à des industries agro-alimentaires ou à des sites accueillant du public (fermes, gîtes).

Les PRV se limitent à un seul site de prélèvement pour *Pseudomonas spp.* et l'influence du type d'adduction d'eau n'a donc pas été étudiée pour *Pseudomonas spp.*

Le Tableau C-II montre que les prévalences et les concentrations de *P. aeruginosa* ne sont pas significativement différentes selon le type d'adduction d'eau (AEP ou PRV).

Tableau C-II. Statistiques concernant la prévalence et les concentrations de *P. aeruginosa* dans les UDI en fonction du type d'adduction (PRV ou AEP)

Volume analysé (mL)		<i>P. aeruginosa</i>			
		250		100	
Origine de l'eau distribuée		PRV	AEP	PRV	AEP
Données relatives à la prévalence	Nombre total	97	541	478	2085
	Positif	5	37	10	65
	Prévalence <i>P</i> (%)	5,2	6,8	2,1	3,2
	IC de <i>P</i> (à 95%)	[2,3 - 11,5]	[5,0 - 9,3]	[1,2 - 3,8]	[2,5 - 4,0]
Données relatives aux dénombrements log (ufc/mL)	Minimum	-2,40	-2,40	-2,00	-2,00
	10 ^{ème} perc.	-2,40	-2,40	-2,00	-2,00
	25 ^{ème} perc.	-2,40	-2,40	-2,00	-1,52
	Médiane	-1,36	-1,80	-1,31	-1,07
	75 ^{ème} perc.	-0,97	-0,80	-0,80	-0,40
	90 ^{ème} perc.	-0,59	-0,49	-0,77	0,34
	Maximum	-0,59	-0,22	-0,70	1,34
	Moyenne	-1,54	-1,57	-1,34	-0,97
	Écart type	0,74	0,75	0,53	0,81

perc. : percentile

IC : intervalle de confiance

b. Prévalence et concentration des *Pseudomonas* dans les UDI en fonction de l'origine de l'eau : souterraine (ESO), superficielle (ESU), mixte (EMI) ou mer (MER) (AEP seulement – PRV exclus)

L'origine de l'eau distribuée présente un rôle déterminant sur la prévalence de *P. aeruginosa* (tableau C-II). Pour les eaux distribuées produites à partir d'eaux souterraines (ESO), plus de 10% des analyses révèlent la présence de *P. aeruginosa* contre moins de 5% pour les eaux d'origine mixte (EMI) et les eaux d'origine superficielle (ESU). Aucune différence n'est à relever pour *Pseudomonas spp.* mais le nombre de données est plus limité.

Les concentrations dans les échantillons dans lesquels *P. aeruginosa* a été dénombré ne sont pas significativement différentes selon l'origine de l'eau distribuée (quelque soit le volume analysé).

À noter : Pour les CAP, dans la base de données fournie, seules figurent des analyses sur l'origine « eau souterraine - ESO », ce qui ne permet pas d'effectuer une comparaison des résultats en fonction de l'origine des prélèvements.

Tableau C-III. Statistiques concernant la prévalence et les concentrations de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp* dans les UDI en fonction de l'origine de l'eau (ESO, ESU, EMI, MER) – PRV exclus

Volume analysé (mL)		<i>P. aeruginosa</i> 100				<i>P. aeruginosa</i> 250				<i>Pseudomonas spp</i>			
Origine de l'eau distribuée		ESO	EMI	ESU	MER	ESO	EMI	ESU	MER	ESO	EMI	ESU	MER
Données relatives à la prévalence	Nombre total	271	152	1487	158	27	18	113	380	78	-	1073	-
	Positif	31	5	20	8	5	1	2	29	2	-	45	-
	Prévalence <i>P</i> (%)	11,4 ^{ab}	3,3 ^a	1,3 ^b	5	18,5 ^d	5,6	1,6 ^d	7,6	2,6	-	4,2	-
	IC de <i>P</i> (à 95%)	[7,7 - 15,2]	[1,5 - 7,5]	[0,8 - 2]	[2,6 - 9,7]	[8,3 - 36,9]	[1,6 - 26,0]	[0,5 - 5,7]	[5,3 - 10,7]	[0,1 - 8,8]	-	[3,2 - 5,6]	-
Données relatives aux dénombrements log (ufc/mL)	Minimum	-2	-1,70	-2,00	-2,00	-2,40	-	-	-2,40	-	-	-2	-
	10^{ème} perc.	-2	-1,70	-2,00	-2,00	-2,40	-	-	-2,40	-	-	-2	-
	25^{ème} perc.	-1,52	-1,40	-1,70	-1,52	-2,10	-	-	-2,40	-	-	-1,22	-
	Médiane	-1	-0,92	-1,35	-0,87	-1,08	-	-	-1,80	-	-	-0,82	-
	75^{ème} perc.	-0,15	0,08	-0,85	-0,40	-0,69	-	-	-0,92	-	-	-0,38	-
	90^{ème} perc.	0,34	0,82	-0,05	-0,30	-0,40	-	-	-0,55	-	-	0	-
	Maximum	1,34	0,82	0,48	-0,30	-0,40	-	-	-0,43	-	-	0,30	-
	Moyenne	-0,85	-0,62	-1,13	-0,93	-1,33	-	-	-1,61	-	-	-0,87	-
	Écart type	0,86	0,94	0,76	0,57	0,78	-	-	0,71	-	-	0,6	-

- données insuffisantes pour caractériser les quantiles

^{ab,d} significativement différents (<0.05)

perc. : percentile

IC : intervalle de confiance

C4/ Étude des relations entre *Pseudomonas* et les autres paramètres :

a. Relation entre *Pseudomonas* et chlore libre

Il existe dans la base SISE-Eaux près de 2500 enregistrements où le chlore libre et *P. aeruginosa* (analyses sur 100 et 250mL regroupées) ont été analysés sur un même échantillon. L'ensemble des types d'eaux analysées (CAP, TTP, UDI) et des types de contrôle (CS ou S1-S3) ont été pris en compte.

Les proportions d'échantillons présentant une concentration quantifiable de *P. aeruginosa* ont été comparées pour différentes classes de concentrations de chlore libre. La figure C-2 illustre l'influence de la concentration de chlore libre pour des analyses sur 100 mL. La concentration en chlore libre a une influence sur la prévalence de *P. aeruginosa* : la proportion d'échantillons contaminés par *P. aeruginosa* quand la concentration en chlore libre est supérieure à 0,3 mg/L est significativement plus faible que pour des concentrations en chlore libre inférieures à 0,3 mg/L. Ainsi, la présence de fortes concentrations de chlore libre semble défavorable à la présence et aux fortes concentrations de *P. aeruginosa*. Toutefois, le faible nombre d'échantillons présentant une concentration quantifiable de *P. aeruginosa* pour les fortes concentrations de chlore libre pourrait également s'expliquer par le faible nombre d'échantillons prélevés ayant de fortes concentrations en chlore libre.

Le même phénomène est observé pour *P. aeruginosa* dans 250 mL.

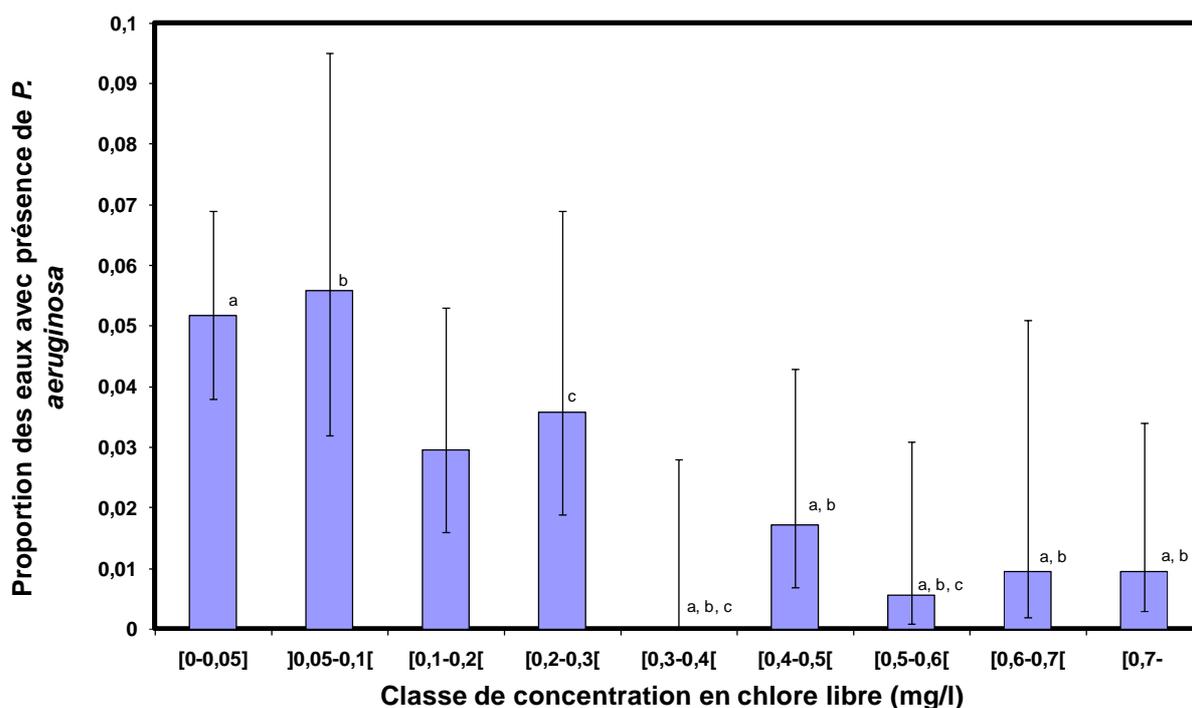


Figure C-2. Influence de la concentration en chlore libre sur la probabilité de présence de *P. aeruginosa* (prévalence dans 100 mL). Les classes marquées d'indice différent sont significativement différentes.

La concentration en chlore libre a également une influence sur la prévalence de *P. spp* : la proportion d'échantillons contaminés est significativement plus faible quand la concentration en chlore libre est supérieure à 0,1 mg/L (Figure C-3).

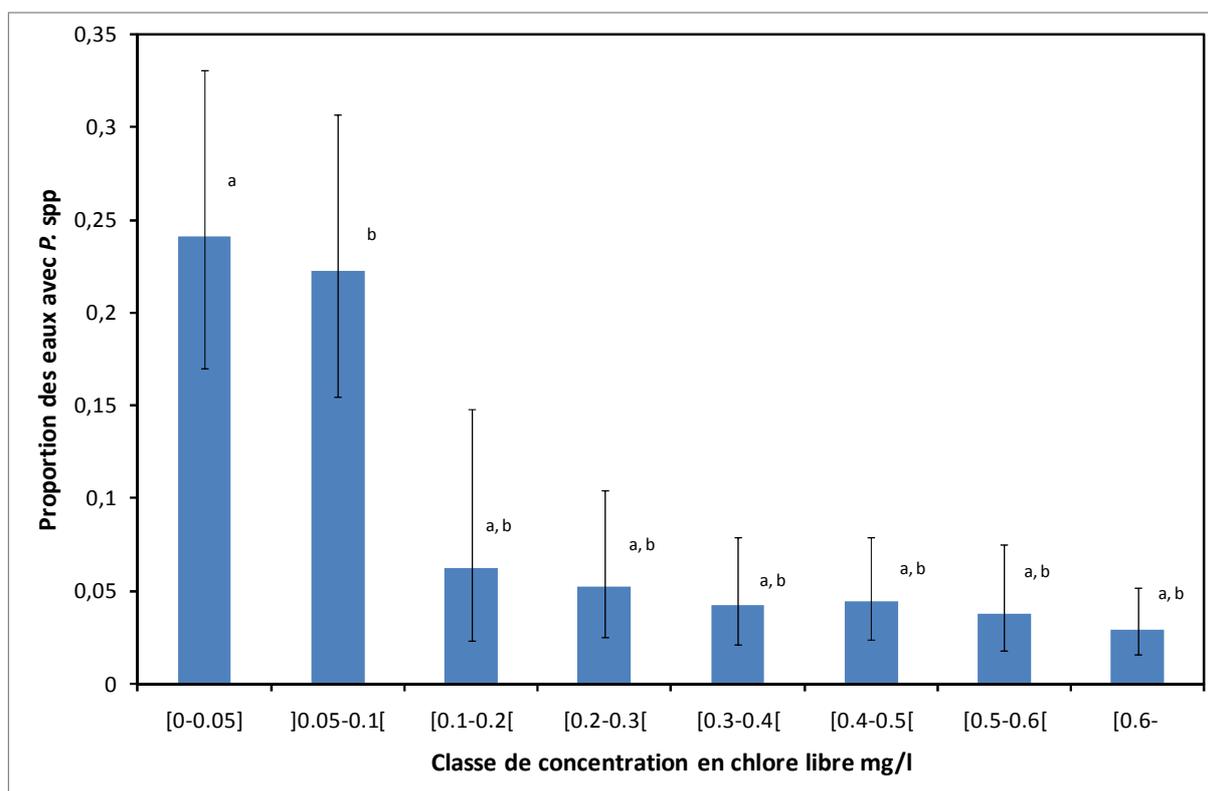


Figure C-3. Influence de la concentration en chlore libre sur la probabilité de présence de *P. spp.*
Les classes marquées d'indice différent sont significativement différentes.

À noter : les classes ont été définies de 0,1 en 0,1 sauf pour les concentrations en chlore libre inférieures à 0,1 mg/L. En effet, en dessous de cette valeur, on trouve deux types de résultats : ceux exprimés en terme semi-quantitatif (« <0,05 » : correspondant au seuil de quantification analytique) et ceux chiffrés supérieurs à 0,05. Il a été décidé de considérer deux classes : une première regroupant les données de 0 mg/L à < 0,05mg/L et une deuxième regroupant les données >0,05 mg/L et < 0,1 mg/L.

b. Corrélation entre *Pseudomonas* et flore totale (bactéries aérobies revivifiables) mesurées par différentes méthodes « GT22 », « GT37 », « GT36-44 » et « GT22-68 »).

Entre 1996 et 2009, période pendant laquelle les analyses ont été effectuées, les méthodes d'analyse des bactéries aérobies revivifiables ont évolué. C'est la raison pour laquelle les résultats sont divisés en 4 catégories : Bactéries aérobies revivifiables à 22°C -68h (GT22-68), à 22°C -72h (GT22), à 36°C -44h (GT36_44) et à 37°C -24h (GT37).

Les analyses de corrélation montrent que les concentrations en *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* ne sont pas corrélées à la concentration en flore totale et ce quelle que soit la méthode utilisée. La flore totale ne peut-être considérée comme un bon indicateur de la présence ou des niveaux de contamination en *Pseudomonas*.

L'exploitation de la base de données SISE-Eaux permet d'obtenir une indication des niveaux de prévalence et de concentration de *P. aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* qui peuvent être retrouvés dans les eaux de distribution. Toutefois pour caractériser plus précisément l'exposition à ces bactéries, un plan de surveillance devrait être mis en place afin d'obtenir des résultats représentatifs au niveau national.

ANNEXE D

Méthodes d'analyse

Dans le domaine de l'eau, le seul référentiel en vigueur pour les *Pseudomonades* est la norme d'essai NF EN ISO 16266¹⁰ (août 2008) qui définit une méthode par culture visant à détecter et dénombrer les *P. aeruginosa*. La méthode décrite dans ce référentiel peut également être employée pour rechercher d'autres espèces de *Pseudomonades*. Cependant, les conditions opératoires décrites dans cette norme ne sont certainement pas optimales pour la détection par exemple des espèces psychrophiles.

La question des bactéries viables-non cultivables (VNC) est importante car selon la méthode d'analyse utilisée, elles seront, ou non, détectées. En effet, une bactérie confrontée à des facteurs défavorables pour sa survie, se retrouve dans des conditions stressantes qui conduisent rapidement à la perte de sa capacité à se multiplier sur un milieu de culture et elle devient alors non cultivable. Certaines de ces bactéries peuvent néanmoins conserver une activité métabolique mesurable par des approches cellulaires. Elles sont alors considérées comme viables mais non cultivables (VNC). Si les méthodes d'analyse basées sur la biologie moléculaire peuvent les dénombrer, celles basées sur la culture en sont incapables. Le devenir des cellules VNC est encore discuté, notamment en ce qui concerne leur capacité à redevenir viable et, pour les pathogènes, à garder leur pouvoir de virulence.

D1/ Mise en évidence des Pseudomonades par culture sur milieu sélectif ou non

- Concentration par filtration

Différentes méthodes ont été décrites. Généralement, une concentration préalable par filtration d'un volume d'eau défini (100 mL ou 250 mL) au travers d'une membrane de porosité moyenne de 0,22 µm ou 0,45 µm est réalisée. Le volume d'échantillon analysé est variable selon les travaux. Dans certaines études des volumes de 100 mL sont filtrés pour la détection de *Pseudomonas* dans les eaux (Golas *et al.*, 2002; Grabinska-Loniewska *et al.*, 2007). Il en est de même pour Eckmanns *et al.* (2008), lors de l'investigation d'une épidémie à *P. aeruginosa* due à la consommation d'eaux conditionnées alors que pour ce type d'échantillon la réglementation européenne (directive du Conseil 98/83/CE) prescrit une analyse sur des volumes de 250 mL.

Très peu d'études, décrivent l'utilisation de méthodes d'ensemencement direct d'un volume d'eau non concentré. Lorsque ce type de méthode est employé, on réalise généralement un pré-enrichissement sur bouillon préalablement à l'incubation sur milieu sélectif (Graindorge *et al.*, 2009).

- Ensemencement

À l'issue de cette première étape de concentration, un ensemencement sur milieu approprié est réalisé soit directement en utilisant la membrane ayant retenu les bactéries, soit à partir d'une fraction du bouillon de pré-enrichissement

¹⁰ NF EN ISO 16266 - Août 2008 - Indice de classement : T 90-419 : Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* - Méthode par filtration sur membrane (*anciennement norme NF EN 12780 (2002))

L'ensemencement peut s'effectuer avec un milieu nutritif sélectif ou non, liquide ou solide. Depuis plus de 50 ans, un très grand nombre de milieux ont été développés pour détecter ces bactéries ce qui ne permet pas d'être exhaustif et, par suite, de tous les présenter.

La méthode normalisée NF EN ISO 16266 (Août 2008) préconise l'incubation sur un milieu sélectif gélosé à base de cétrimide et d'acide nalidixique. L'emploi de ces composants a pour objectif d'inhiber la flore interférente sans influencer la viabilité des *P. aeruginosa* qui sont résistantes à cet ammonium quaternaire et à cet antibiotique. L'utilisation de sulfate de potassium et de chlorure de magnésium a pour objectif de favoriser la pigmentation des *P. aeruginosa* qui se compose essentiellement de pyocyanine ou pigment bleu-vert. Il est toutefois important de noter qu'un pourcentage significatif des bactéries de cette espèce ne présente pas ce phénotype bleu-vert sur ce milieu. L'utilisation de ce crible peut donc induire une sous-estimation des concentrations estimées.

D'autres milieux de culture peuvent être employés tel que le milieu King A qui favorise également la synthèse de la pyocyanine (Golas *et al.*, 2002). De manière à détecter plusieurs espèces de Pseudomonades, Grabinska-Lionievska *et al.* (2007) emploient plutôt un milieu King B favorisant la synthèse d'un pigment jaune vert fluorescent (pyoverdine) synthétisé par de nombreuses espèces appartenant à cette famille. Eckmanns *et al.* (2008) opèrent un pré enrichissement sur bouillon au vert de malachite puis un étalement sur gélose Mac Conkey. Une méthode similaire avec des milieux dont la composition est adaptée à la recherche des *Burkholderia cenocepacia* est employée par Graindorge *et al.* (2009) dans le cadre d'une investigation sur des échantillons hydriques. L'utilisation de milieux non sélectifs a également été décrite par différents auteurs. Ainsi par exemple Vachée *et al.* (1997) utilisent un milieu de type R2A pour isoler des *Pseudomonas* dans des eaux et Teixeira *et al.* (2001) un bouillon « Cœur-cervelle ». Pour ces derniers auteurs, l'emploi de milieux non sélectifs, permettrait d'améliorer l'isolement et la détection des souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentes dans l'eau dans un état de stress métabolique et qui sont plus difficilement cultivables.

La température d'incubation diffère d'une étude à l'autre. Ceci peut s'expliquer par la grande variété d'espèces appartenant à cette famille qui peuvent être pour certaines psychrophiles et donc ne pas se multiplier à des températures >20°C. À l'inverse, l'espèce *P. aeruginosa* peut survivre à 4°C mais est alors incapable de se multiplier ce qui fait qu'elle ne sera pas détectée si cette condition opératoire est utilisée. Notons que pour la détection des *P. aeruginosa* la norme d'essai NF EN ISO 16266 (Août 2008) prescrit une température d'incubation de 36°C±2°C pendant 44h±4 heures. Cette dernière température d'incubation est souvent employée dans les études publiées pour rechercher spécialement cette espèce. Compte tenu de ces considérations et de manière à détecter un panel d'espèces relativement important, il apparaît nécessaire de multiplier le nombre d'analyses et d'employer différentes températures d'incubation. Cette stratégie est ainsi utilisée par Grabinska-Lionievska *et al.* (2007) dans leur étude avec des températures d'incubation de 7°C, 30°C et 42°C et des temps d'incubation variables d'une durée de 2 à 10 jours selon la température. Généralement les températures d'incubation décrites dans les travaux scientifiques se situent dans la gamme 20°C à 32°C dans laquelle un grand nombre d'espèces de Pseudomonades sont capables de se multiplier.

- Identification

La confirmation et l'identification des Pseudomonades détectées par ces différentes méthodes est très souvent réalisée dans une dernière phase de l'analyse soit grâce à l'emploi de trousseaux biochimiques miniaturisés, soit par la réalisation de macro essais spécifiques visant par exemple pour les *P. aeruginosa* à tracer la production d'ammoniaque, la synthèse d'une oxydase ou de la pyoverdine. Ainsi, dans le cadre de la norme NF EN ISO 16266, la confirmation ou non des souches isolées est faite sur la base de critères essentiellement morphologiques (pigmentation caractéristique) via des tests spécifiques visant à confirmer la présence de différentes voies métaboliques (Tableau D-I reprenant les tests de confirmation à effectuer selon l'aspect morphologique des colonies de *P. aeruginosa* détectées).

Tableau D-I — Étapes requises pour la confirmation des colonies se développant sur la gélose CN selon la norme NF EN ISO 16266

Description des colonies sur gélose CN	Ammoniac à partir d'acétamide	Production d'oxydase	Fluorescence sur milieu de King B	Confirmées comme <i>P. aeruginosa</i>
Bleu-vert	NT*	NT	NT	oui
Fluorescence (pas bleu-vert)	.	NT	NT	oui
Brun rougeâtre	.	.	.	oui
Autres types	NT	NT	NT	non

*NT: Non testé.

De plus en plus souvent des techniques moléculaires sont employées pour confirmer l'identification de ces bactéries (Lavenir *et al.*, 2008; Perola *et al.*, 2002).

D2/ Autres méthodes de détection des *Pseudomonades* dans les eaux

Depuis l'apparition des méthodes d'amplification génique (PCR) dans les années 1990, plusieurs auteurs ont développé des méthodes permettant la détection de différentes espèces de *Pseudomonades* qui sont très souvent employées dans un objectif de confirmation et d'identification des souches isolées par des techniques classiques de culture sur milieu solide. Ainsi, Campbell *et al.* (1995) proposent un protocole de PCR qualitatif visant l'ARN 16S de *Burkholderia cepacia*. Cette méthode peut être appliquée sur des bactéries cultivées ou directement pour réaliser l'analyse de la présence de cette espèce dans des prélèvements biologiques. Plus de 10 ans après, certains auteurs travaillent encore pour améliorer l'identification de cette même espèce en visant plusieurs gènes à la fois. C'est le cas de Graindorge *et al.* (2009) qui recherchent chez cette espèce 11 gènes distincts responsables entre autres de la production de protéines de structures, enzymatiques ou encore impliqués dans la réponse du système SOS d'aide à la réparation de l'ADN. La même démarche est adoptée par Lavenir *et al.* (2008) qui visent 14 gènes distincts impliqués dans la virulence des *P. aeruginosa*.

Notons que l'identification des souches détectées après amplification génomique peut être réalisée par différentes méthodes soit en comparant la taille de fragments génomiques obtenus par digestion enzymatique (Restriction Fragment Long Polymorphism), soit en déterminant directement la composition nucléotidique des gènes amplifiés par séquençage, soit enfin par d'autres méthodes.

L'utilisation de méthodes basées sur le principe de l'hybridation moléculaire de sondes a également été décrite (Stender *et al.*, 2000; Vachee *et al.*, 1997).

De nombreuses autres méthodes plus ou moins complexes ont également été décrites pour détecter les *Pseudomonades* dans les eaux telles que celles qui utilisent une méthode d'impédancemétrie employée après culture sur milieu sélectif (bouillon Z) permettant de détecter les *P. aeruginosa* (Szita *et al.*, 2007) ou celles qui utilisent pour évaluer dans un premier temps l'efficacité de différents traitements de potabilisation une méthode de cytométrie en flux pour trier les bactéries actives (présence d'une membrane externe intacte ou d'une activité enzymatique intracellulaire), suivie d'une identification des *Pseudomonades* détectées par PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Hoefel *et al.*, 2005).

D3/ Évolution des méthodologies vers une détection des clones épidémiques

Aujourd'hui, il devient impératif de faire évoluer les méthodes de détection au niveau de l'espèce vers des systèmes de détection intégrant les données de génétique des populations qui montrent que pour des espèces telles que les *P. aeruginosa* et les Bcc, des éclosions épidémiques sont à l'origine de l'émergence de clones plus fortement transmissibles ou virulents et très clairement différenciés au sein de ces espèces. Les phénomènes liés à leur émergence semblent multi-factoriels et peuvent impliquer des acquisitions d'ADN, des réarrangements génomiques et la sélection de mutations particulières. Des signatures moléculaires permettent leur identification. L'étude des gènes conservés au sein de l'ensemble des génomes de ces espèces et de leurs relations permettent une identification des lignées et une appréciation de leur répartition et transmissibilité. Ces méthodes sont aujourd'hui regroupées sous deux grandes appellations :

- la MLSA « multi-locus sequence analysis », basée sur une analyse des divergences génétiques entre paires de séquences d'un même gène pour un ensemble de souches d'une espèce (ou population) en utilisant les outils de la phylogénie moléculaire.
- la MLST « multi-locus sequence typing » qui étudie plus simplement la répartition des types alléliques (séquence type = une séquence ayant au moins une différence avec les autres séquences décrites à ce jour) d'un ensemble de gènes au sein d'un ensemble de souches d'une espèce (ou population).

Pour ces deux méthodes environ 7 gènes distincts répartis sur l'ensemble d'un génome sont analysés et elles peuvent être par la suite utilisées dans le but d'élaborer des cribles « clone – spécifique ». Par exemple, un gène ou îlot génomique peut montrer une distribution restreinte à un clone détecté par MLSA ou MLST et être utilisé comme marqueur: c'est le cas du gène *cblA* qui est fortement lié à l'émergence du clone ET12 du Bcc lui même fortement transmissible au sein des cohortes d'individus atteints de mucoviscidose. Il en est de même pour les clones de l'espèce *P. aeruginosa*. Ces clones montrent des mutations particulières permettant l'élaboration de cribles spécifiques. Ces diagnostics à l'échelle du clone présentent l'avantage de proposer une hiérarchie dans l'appréciation de la dangerosité des souches détectées, avec la possibilité d'une proposition d'interventions différentes en fonction des clones détectés.

ANNEXE E

Facteurs de Virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

Plusieurs aspects de la virulence de l'espèce *P. aeruginosa* ont été décrits. Les principaux facteurs sont détaillés ci-dessous, en complément de ceux décrits précédemment et impliqués dans les infections du tractus intestinal (cf. paragraphe V.1. de ce rapport).

Deux grandes catégories de propriétés de virulence peuvent être définies :

- **les aspects concernant l'acclimatation à l'hôte, l'adhérence ou la perturbation des barrières épithéliales**, notamment :
 - de nombreux éléments impliqués dans les phénomènes de régulation transcriptionnelle des gènes. La grande complexité des processus de cette catégorie est présentée dans l'article de Wang *et al.* (1996) qui décrit plus de 20 loci génétiques comme apportant une contribution significative à la virulence des *P. aeruginosa*, avec un impact direct sur la dose létale induisant 50% (DL50) de décès chez un modèle murin.
 - les organelles (ou adhésines) de surface permettant une adhérence aux cellules de l'hôte et, dans certains cas, une organisation sous forme de biofilm. Ce sont principalement les pili et les flagelles mais aussi les filaments à base de protéine PstS décrits au paragraphe V.1. de ce rapport.
 - des lectines solubles interagissant avec les LPS (lipopolysaccharides) ou autres composés de la surface bactérienne qui peuvent également jouer un rôle significatif dans les propriétés d'adhérence et le développement sous forme de biofilm. En plus de la lectine soluble PA-I décrite au paragraphe V.1. de ce rapport, la lectine soluble PA-II pourrait être impliquée dans la reconnaissance et l'adhésion aux cellules de l'hôte (Imberty *et al.*, 2004).

- **les aspects concernant l'excrétion ou la sécrétion de métabolites secondaires, toxines ou enzymes** fragilisant l'hôte ou favorisant la multiplication du micro-organisme. Pour illustration:
 - Les systèmes de sécrétion de type I et II contribuent à l'excrétion d'exo-produits (toxines et enzymes de dégradation) dans l'environnement des cellules, notamment :
 - des hémolysines : rhamnolipides (cf. paragraphe V.1. de ce rapport) et phospholipase C qui agissent sur les phospholipides solubilisés, et libèrent de la phosphatidylcholine (Berka et Vasil, 1982). Ce substrat se retrouve, entre autre, dans le surfactant pulmonaire.
 - la leucocidine possédant une activité lytique principalement sur les leucocytes (Hirayama *et al.*, 1984).
 - des enzymes extra-cellulaires : lipases et protéases dont les élastases qui permettent la protéolyse de l'élastine, principale composante de la matrice extracellulaire favorisant la formation des tissus biologiques tels que ceux des poumons (Twining *et al.*, 1993). La protéolyse de l'élastine fragilise les tissus pulmonaires et contribue à l'évolution d'une infection aiguë vers une forme chronique chez les individus atteints de mucoviscidose
 - l'exotoxine A (décrite au paragraphe V.1. de ce rapport)
 - une entérotoxine (décrite au paragraphe V.1. de ce rapport),
 - le lipide A des LPS (lipopolysaccharides) membranaires qui s'insère dans la membrane bactérienne, un noyau oligosaccharidique et un polysaccharide antigène-O variable. Lors de la lyse de ces cellules bactériennes, le lipide A

devient une toxine qui peut être responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant mener à des chocs septiques (Ernst *et al.*, 2003).

- un polymère de type alginate produit par les souches muqueuses qui provoque une obstruction de l'arbre pulmonaire et contribue également à réduire l'exposition de cette bactérie au système immunitaire et aux antibiotiques.
 - des sidérophores (pyoverdine et pyocheline) décrits au paragraphe V.1. de ce rapport
- Le système de type III sécrète des toxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il est important de noter que ces facteurs sécrétés par cette voie ne sont pas exprimés chez tous les clones de *P. aeruginosa* et qu'un clone *exoS* positif ne possède jamais l'aptitude à produire l'effecteur ExoU.
- L'exoenzyme S possède une activité GTPase vis-à-vis de la protéine Rho et une activité ADP-ribosyltransférase sur les « GTP-binding proteins », la vimentine ainsi que les IgG et IgA (Fraylick *et al.*, 2002; Sundin *et al.*, 2004). Cette exoenzyme induit une inhibition de la phagocytose et contribue à l'induction de l'apoptose (ou mort programmée) des macrophages.
 - L'exoenzyme T est similaire à 75% à l'exoenzyme S, et possède des activités similaires (Barbieri et Sun, 2004).
 - L'exoenzyme U est décrite au paragraphe V.1. de ce rapport.
 - L'exoenzyme Y induit une accumulation d'AMPcyclique *via* son activité adénylate cyclase (Lory *et al.*, 2004) qui induit des dysfonctionnements cellulaires.

Il est à noter que cette liste n'est pas exhaustive et que d'autres voies de sécrétion peuvent contribuer à la virulence de *P. aeruginosa*.

Le tableau E-I présente les associations décrites entre certains facteurs de virulence de *P. aeruginosa* et les organes ou tissus infectés.

Tableau E-I Facteurs de virulence de *P. aeruginosa* détectés lors de l'infection de certains organes/tissus (D'après Lavenir, 2007).

	Entéro-toxine	Filament PstS	Elastase A	Elastase B	Protéase alcaline	Phospho-lipase C	alginate	Lectines PAI PAII	Protéase IV	Exotoxine A	Pili IV	Pyocyanine (sidérophore)	Rhamno-lipides	ExoS	ExoU
Poumon (infection chronique)			+	+		+	+	+				+	+		
Poumon (infection aiguë)						+		+		+			+	+	+
Voie urinaire							+						+		
Peau										+				+	
Sang						+			+				+		
Cornée									+		+			+	+
oreille			+	+	+										
Tractus intestinal	+	+						+		+		+	+		+