
ETUDE PRELIMINAIRE DE L'EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA SURVIE D'*AEROMONAS HYDROPHILA*

S. EL MEJRI^{1*}, M. EL BOUR¹, I. BOUKEF¹, R. MRAOUNA¹, P. GOT²,
M. TROUSSELIER² ET A. BOUDABBOUS³

¹ Laboratoire de Pathologie des Organismes Aquatiques- INSTM- Rue 2 Mars 1934, 2025 Salammbô, Tunisie.

² Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires UMR CNRS 5119- Université Montpellier II, France.

³ Laboratoire de Microbiologie et des Molécules Bio Actives- Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie.

* Auteur correspondant: E-mail: mejri_selma@yahoo.fr

RESUME

La survie d'*Aeromonas hydrophila* B₃ dans différentes conditions environnementales (eau minérale, eau de mer avec ou sans exposition aux rayonnements solaires) a été étudiée afin de déterminer les modifications éventuelles acquises par cette espèce après passage dans différents milieux réceptifs. Ainsi, nous avons procédé au suivi des caractéristiques notamment: cultivabilité, intégrité membranaire, morphologiques, profils biochimiques et antibiologiques. Les résultats obtenus montrent qu'*Aeromonas hydrophila* B₃ soumise à différentes conditions de stress environnementaux, passe à la forme viable non cultivable (VNC). Les réponses les plus remarquables concernent les bactéries incubées en eau de mer et qui ont été exposées aux rayonnements solaires pendant 24h. Parallèlement, nous avons trouvé qu'*Aeromonas hydrophila* B₃ a subi différentes modifications par rapport à l'état initial. Ces modifications touchent plusieurs de ces caractéristiques morphologiques, biochimiques et antibiologiques.

Mots clés: *Aeromonas hydrophila*, survie, forme viable non cultivable.

ABSTRACT

A survival of *A. hydrophila* B₃ has been conducted in different conditions (mineral water, seawater exposed or not to the sunlight). Also, unculturable forms have been detected by using epifluorescence microscopy. Thus, different kinds of microcosms were prepared using filtered and autoclaved marine water or mineral water, inoculated by *A. hydrophila* B₃ and maintained or not in room light. Further, we tested the survival of *A. hydrophila* B₃ incubated in seawater and exposed to sunlight. Our results revealed that the culturable count of *A. hydrophila* B₃ incubated in different conditions declined. Nevertheless, no variations were obtained for the total bacterial cells. Morphological, biochemical and antimicrobial modifications were noted.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, survival, viable but non culturable state.

INTRODUCTION

Aeromonas hydrophila est une espèce non entérobactérie: coccobacille, Gram-, mobile, anaérobie facultative et opportuniste dans l'environnement aquatique^{1, 2, 3, 4}. Elle fut impliquée dans différents types de cas pathologiques en eau de mer^{5, 6, 7, 8, 9}. La survie de cette espèce en milieu marin est compromise par l'entrée dans un état viable non cultivable¹⁰. Afin, d'évaluer l'effet des

conditions du milieu (oligotrophie, salinité, rayonnements solaires) sur la survie *in vitro* d'*Aeromonas hydrophila*, nous avons réalisé des suivis de culture de la bactérie en eau de mer ou en eau minérale exposée ou non à la lumière. Ainsi, nous avons pu établir un constat des conditions ambiantes (notamment l'embouteillement de l'eau) et le risque de contamination par les formes non cultivables.

MATERIEL ET METHODES

Le modèle bactérien et caractérisation biochimique de l'espèce

Aeromonas hydrophila utilisée dans la présente étude est une souche de laboratoire (B₃) isolée d'anguille « *Monopterus albus* » du département de Microbiologie Vétérinaire de l'Université Agricole et Vétérinaire du Danemark. Les caractéristiques biochimiques de la souche d'origine sont

données par le tableau I. Les cultures d'*Aeromonas hydrophila* (B₃) ont été préparées en bouillon Trypto Casein Soja Broth (TS, BIORAD), puis purifiées sur gélose Mueller Hinton (MH, BIORAD). L'identification de la bactérie a été confirmée par l'utilisation de tests conventionnels (Coloration de Gram, mobilité, oxydase et catalase) couplée à l'utilisation du système Api 20 NE (Bio Mérieux, France).

Tableau I: Caractéristiques biochimiques de la souche *Aeromonas hydrophila* (B₃).

	Gram	Mobilité	Hémolyse	Ox	Cat	DCA	DCL	DCO	URE	IND	VP	GLU	O-ser	AMX
B ₃	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	O13	R

Nota: Ox: oxydase; Cat: catalase; DCA: Décarboxylase arginine; DCL: Décarboxylase lysine; DCO: Décarboxylase ornithine; URE: uréase; IND: indole; VP: Voges-Proskauer; Glu: glucose; O-ser: O-serotype; AMX: Amoxiciline; R: résistant.

Caractéristiques antibiotypiques

Le profil de résistance aux antibiotiques a été réalisé selon la méthode décrite par Chabbert et al.¹¹. Nous avons utilisé 11 antibiotiques: Streptomycine (10µg), Tobramycine (10µg), Chloramphenicol, Tetracycline (30µg), Furanes (300µg), Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25µg), Rifampicine (30µg), acide oxalinique (10µg), Novobiocine (30µg), Amoxicilline (25µg) et Oxacilline (1µg) (BIORAD, France)¹². Après 24h d'incubation à 32°C, les souches ont été classées comme sensibles, intermédiaires ou résistantes¹³.

Préparation de l'inoculum

Une colonie d'*A. hydrophila* de 24h/37°C, prélevée sur gélose MH, est ensemencée dans 200ml de bouillon TS et incubé au bain marie à 37°C pendant 18h (phase stationnaire). La culture a ensuite été centrifugée à 3000tr/mn pendant 10min et lavée 3 fois à l'aide d'eau physiologique (9‰ NaCl) pour éliminer toute trace de matière organique apportée par le bouillon TS. La suspension ainsi obtenue est diluée au 1/10^{ème} dans un volume final de 40ml constituant l'inoculum utilisé pour ensemencer les microcosmes. A l'état initial, nous avons procédé au dénombrement de l'inoculum par microscope en épifluorescence. Considérant ce dénombrement nous avons réglé le volume de l'inoculum dans les microcosmes à la charge de 10⁷ cellules totales/ml.

Préparation des microcosmes

Dix-huit microcosmes (bouteilles en pyrex) de 200ml de volume ont été préparés: 6 microcosmes pour la survie d'*A. hydrophila* en eau de mer naturelle (obscurité et température ambiante, 90j), 6 microcosmes pour la survie de cette espèce en eau minérale (lumière et température ambiante, 90j) et enfin 6 autres microcosmes remplis d'eau de mer ont été exposés aux rayonne-

ments solaires (24h). L'ensemble de ces solutions a été autoclavé et filtré sur membrane en nitrocellulose de porosité 0.2µm (Nucléopore). Ces différentes solutions ont été inoculées par le même inoculum d'*A. hydrophila* à la charge de 10⁷ cellules/ml constituant ainsi les différents microcosmes. Un échantillonnage régulier a été effectué immédiatement après inoculation (T₀) et périodiquement pour chaque suspension cellulaire. Toutes les expériences effectuées ont été menées en duplicat.

Evaluation de la cultivabilité

Les bactéries cultivables ont été dénombrées par des dilutions successives au 1/10^{ème} dans de l'eau physiologique stérile et par étalement (en duplicat) de 0.1ml de chaque dilution sur gélose TS. Après incubation la lecture du nombre d'unités formant colonies ou (UFC) par unité de volume est déterminée à chaque fois.

Dénombrement des cellules totales

Le dénombrement direct des cellules totales a été fait par microscopie en épifluorescence¹⁴. Le dénombrement des cellules totales a été fait en utilisant le fluorochrome SYBR Green (SGI) (*Molecular probes, Inc*). 1ml de l'échantillon à analyser a été dilué dans du Tris-HCl (0.1M), avec 5µl de Sybr Green. L'incubation a été réalisée à l'obscurité pendant 15 min à température ambiante (25°C). Le SYBR green est un fluorochrome ayant une forte affinité pour l'ADN¹⁵. Les échantillons ainsi marqués ont été filtrés stérilement et observés ensuite au microscope en épifluorescence après excitation à une longueur d'onde λ = 490nm. Les cellules totales englobent les bactéries cultivables, bactéries VNC, ainsi que les bactéries mortes¹⁶.

Evaluation de l'intégrité membranaire

La mesure du pourcentage des cellules bactériennes présentant une membrane cytoplasmique altérée est effectuée à l'aide du Kit «LIVE/DEAD» «*BacLight Bacterial viability*» (Molecular probes, Inc). Deux fluorochromes le syto 9 et l'iodure de propidium sont utilisées. Le marquage a été effectué selon les recommandations du fournisseur. Après marquage, les échantillons ont été observés au microscope en épifluorescence. Les cellules présentant une membrane cytoplasmique intacte re-émettent une fluorescence verte après excitation à $\lambda=535\text{nm}$ et les cellules endommagées re-émettent une fluorescence rouge après excitation à $\lambda=490\text{nm}$. Le rapport entre les cellules rouges et les cellules totales donne le pourcentage des cellules dont la membrane est altérée.

Détermination des différentes caractéristiques d'*Aeromonas hydrophila*

Les éventuelles modifications morphologiques, biochimiques et antibiotypiques survenues chez *Aeromonas hydrophila* cultivées en différents microcosmes ont été déterminées et comparées à la forme d'origine initiale.

RESULTATS

Etude de Survie d'*Aeromonas hydrophila* en eau minérale

L'incubation d'*Aeromonas hydrophila* en conditions d'oligotrophie minérale a montré une décroissance progressive de la cultivabilité de l'ordre de 2.45 Ulog (Figure 1a). Le nombre de cellules totales a varié peu durant toute la durée d'incubation. Cependant, 40% de cellules bactériennes passent sous la forme viable non cultivable à la fin du séjour en eau minérale. Le suivi de l'intégrité membranaire en ces conditions, montre une phase constante pendant les 12 premiers jours avant une phase d'altération marquée par un déclin en nombre de cellules intégrées (Figure 1b).

Etude de survie d'*Aeromonas hydrophila* en eau de mer

Dans ce cas le nombre en bactéries cultivables diminue rapidement à partir du 10^{ème} jour de culture en eau de mer filtrée (3.22Ulog au bout de 90 jours). Cependant, le nombre de cellules totales d'*Aeromonas hydrophila* est resté constant: apparition des formes viable non cultivable (VNC) pour 52% des cellules bactériennes (Figure 2a). Le suivi de l'intégrité mem-

branaire au cours de ce stress marin montre aussi un nombre de cellules intégrées constant au début du séjour et qui diminue vers le 10^{ème} jour. Cette intégrité membranaire semble être conservée pour 53% de cellules d'*Aeromonas hydrophila* (Figure 2b).

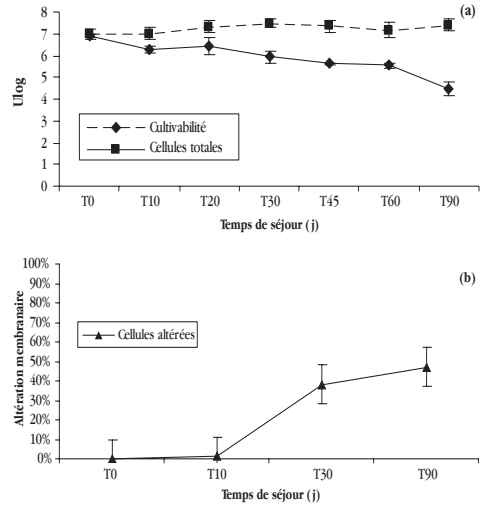


Figure 1. Suivi d'*Aeromonas hydrophila* incubée en eau minérale à la lumière ambiante. (a) Evolution de la cultivabilité et des cellules totales, (b) Evolution de l'intégrité membranaire.

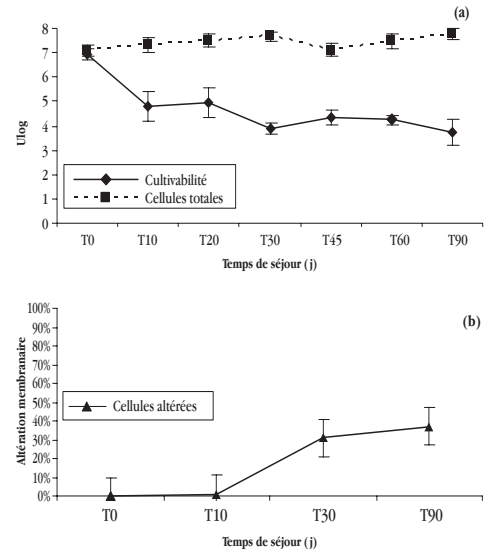


Figure 2. Suivi d'*Aeromonas hydrophila* incubée en eau de mer à l'obscurité. (a) Evolution de la cultivabilité et des cellules totales, (b) Evolution de l'intégrité membranaire.

Etude de l'effet du rayonnement solaire

Dans ce cas, une phase de latence précoce restreinte est observée suivie d'un déclin rapide de la cultivabilité de l'ordre de 3.85Ulog. Notons que pendant l'incubation (24h), les cellules bactériennes sont passées de la phase lumineuse à une phase d'obscurité.

Ainsi, la disparition d'un des facteurs stressants (rayonnement solaire), ne s'accompagne pas d'une

réactivation cellulaire pour les bactéries car la cultivabilité n'a pas augmenté après passage obscur. Cependant, le nombre en cellules totales est resté constant. Aussi, au bout de deux heures d'incubation un passage rapide à la forme viable non cultivable (VNC) a été observé (Figure 3a). Pour l'intégrité membranaire une perte importante en nombre de cellules intactes est observée dès les premières heures d'exposition au soleil (Figure 3b).

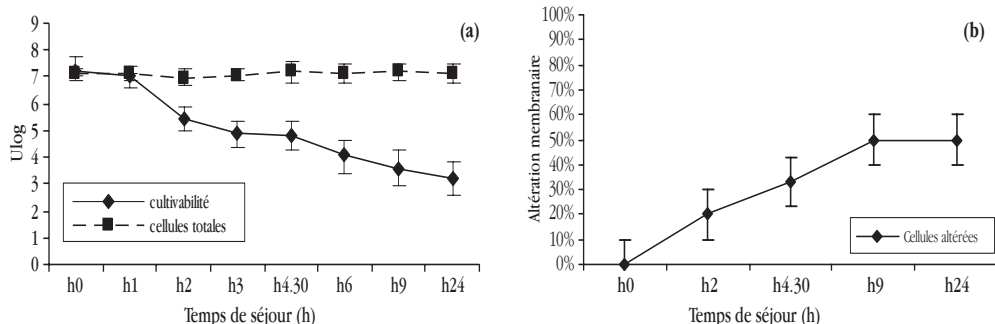


Figure 3. Suivi d'*Aeromonas hydrophila* incubée en eau de mer et exposée aux rayonnements solaires. (a) Evolution de la cultivabilité et des cellules totales, (b) Evolution de l'intégrité membranaire.

Mise en évidence des différents types de modifications

• Modifications morphologiques

En conditions standard, *Aeromonas hydrophila* montre des colonies de 0.3 à 1 μm de diamètre et à contours réguliers. Aussi, les cellules sont des coccobacilles Gram-. Cependant, après culture en conditions de stress (eau marine, eau minérale, eaux usées... etc.), *Aeromonas hydrophila* a subi des

modifications apparentes: (i) les colonies sont devenues de taille très réduite (ii) Apparition de formes cellulaires ovoïdes et allongées pour les différentes conditions de stress subies (Figure 4).

Modifications biochimiques

Les éventuelles modifications biochimiques enregistrées chez *Aeromonas hydrophila* B₃ stressée sont résumées dans le tableau II.

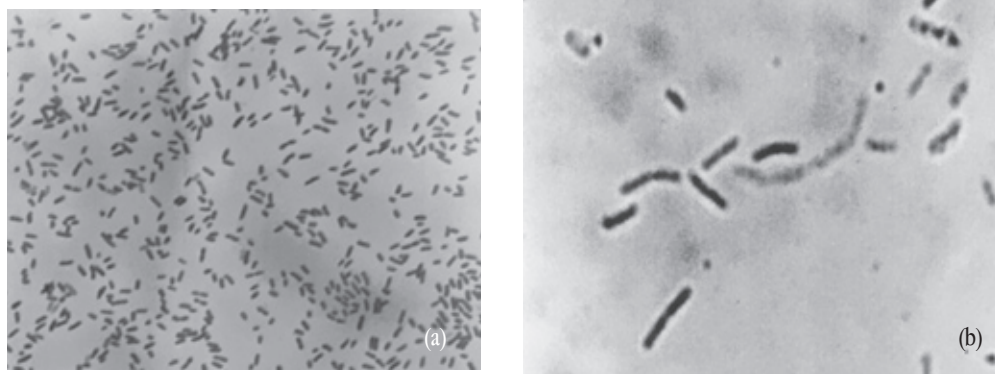


Figure 4. Modifications morphologiques survenues chez *Aeromonas hydrophila* au cours des différents stress. (a) Coloration de Gram d'*A. hydrophila* en conditions standard, (b) Coloration de Gram d'*A. hydrophila* après incubation en conditions d'oligotrophie.

Tableau II. Caractéristiques biochimiques d'*Aeromonas hydrophila* incubée en conditions standard (S0), en eau de mer à l'obscurité pendant 90j (S1), en eau minérale pendant 90j (S2) et en eau de mer exposée aux rayonnements solaires pendant 24h (S3).

	NO ³	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX	CAT
Souches																						
S ₀	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
S ₁	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S ₂	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S ₃	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+

Nota: (+): réponse positive au test; (-): réponse négative au test; O₃: nitrate réductase; TRP: tryptophane désaminase; GLU: glucose; ADH: arginine dihydrolase; URE: uréase; SC: hydrolyse de esculine; GEL: gélatinase; PNPG: p-nitrophényl-β-galactopyranoside; ARA :arabinose; MNE: mannose ; MAN: mannitol; NAG: N-acétyl-glucasamine; MAL: maltose; GNT: gluconate; CAP: caprate; ADI: adipate; MLT: malate; CIT: citrate; PAC: pbényl-acétate; OX: oxydase; CAT: catalase.

• **Modifications antibiotypiques**

Initialement la souche d'*Aeromonas hydrophila* B3 présente une multirésistance à 6 antibiotiques différents: amoxicilline, oxacilline, furanes, rifampicine,

streptomycine et novobiocine. Après un séjour en eau de mer, les modifications du profil de résistance aux antibiotiques d'A. *hydrophila* B₃ est représenté dans le tableau III.

Tableau III. Modifications des profils antibiotypiques de la souche d'*Aeromonas hydrophila* après le séjour conditions de stress.

Souches	Résistance*	Antibiotiques
S ₀ (conditions standard)	6	Amx –Ox-S-Fm -RA-Nov
S ₁ (eau de mer)	2	Amx –Ox
S ₂ (eau minérale)	3	Amx –Ox-Nov
S ₃ (eau de mer + rayonnement solaire)	3	Amx –Ox-Nov

* Différents types de résistances; AMX: amoxicilline; OX: oxacilline; S: streptomycine; Fm: furanes; RA: rifampicine; Nov: Novobiocine; C: Chloramphénicol; SXT: Triméthoprime-sulfamide; AR: Acide oxalinique.

DISCUSSION

Les études antérieures traitant des suivis bactériologiques dans les eaux côtières Tunisiennes ont décrit la présence assez fréquente d'*Aeromonas hydrophila*. Nos résultats concernant le séjour de cette espèce en eau marine soulignent que sa cultivabilité décline de 3.22 Ulog au bout de 90 jours d'incubation. Ces résultats rejoignent plusieurs études effectuées en Tunisie ^{17, 18, 19} qui ont montré une capacité de survie similaire pour cette espèce après séjour en eau de mer. Aussi, l'étude de Laaberki ²⁰ a montré que le stress marin a induit chez *Aeromonas hydrophila* une perte progressive et régulière de la cultivabilité au bout de trois mois de séjour. Par ailleurs, si l'état de la bactérie non cultivable reste viable. Ainsi, par microscopie en épifluorescence nous avons pu déduire le nombre

réel de bactéries VNC ainsi que l'état d'altération cellulaire. Ces résultats ont montré que le nombre en VNC est aussi important que le temps de séjour en eau de mer est plus long. Cet état résulterait d'insuffisance en sources d'énergie disponibles et serait une réponse à la carence nutritive du milieu récepteur ²¹. Ce qui est en concordance avec la diminution de l'intégrité membranaire cellulaire. Aussi, les résultats de l'étude de Mary et al. ² sont similaires à ceux obtenus par notre étude. Néanmoins Caro et al. ²² ont révélé la détérioration membranaire après 30 jours d'incubation en eau physiologique pour *Salmonella typhimurium*. Par ailleurs, *Aeromonas hydrophila* incubée en eau minérale a montré une perte progressive de cultivabilité de l'ordre de 2.45 Ulog. Cependant, sa capacité de survie est meilleure qu'en eau de mer avec une cultivabilité

de 60%. Nos résultats rejoignent ceux de Warburton et al.²³ ainsi que Messi et al.⁵. Aussi, la persistance d'*Aeromonas hydrophila* en eau minérale stérile est meilleure avec une adaptation prononcée pour *Aeromonas hydrophila* isolée de l'environnement aquatique (cas de notre étude) que pour celle isolée en clinique humaine²⁴. Aussi, toutes les études soulignent une invariabilité en cellules totales^{25, 26, 27, 2}. D'après Monfort et al.¹⁰, cette variabilité en nombre de cellules totales suite au stress serait due à la lyse cellulaire ou la mortalité. Pour l'effet du rayonnement solaire sur la survie d'*Aeromonas hydrophila*, nous avons montré une adaptation limitée marquée par une décroissance rapide en nombre de colonies au bout de 24 heures d'exposition (4.64 Ulog). Sevilla et al.²⁸, ont obtenu des résultats similaires ce qui confirme l'effet puissant de la lumière solaire sur l'abatement bactérien²⁹. Par ailleurs, il n'y a pas eu de réactivation des cellules après repos nocturne dans le cas de notre étude à la différence de Laaberki et al.²⁰ ayant montré qu'*Aeromonas hydrophila* récupère son pouvoir de cultivabilité après repos nocturne. Aussi, nos résultats soulignent une altération cellulaire au bout de 24 heures d'exposition aux rayonnements. Il apparaît évident comme l'a souligné auparavant Baleux et al.²¹ que la phototoxicité induit des altérations au niveau des lipides, des protéines membranaires et de l'ADN. Cet état est défini comme étant une réponse précoce au passage en milieux hostiles. Cette forme de résistance se manifesterait par perte de la cultivabilité cellulaire et par les modifications structurales. Parmi ces modifications soulignées par les résultats de notre étude, l'apparition de formes allongées, ovoïdes de très petites tailles. Selon Huisman et al.³⁰ cette forme est due à la condensation cytoplasmique et diminution du volume périplasmique. Ces mêmes formes ovoïdes ont été décrites dans l'étude de Lakhil¹⁹ pour *Aeromonas hydrophila* ayant séjourné en eau de mer et par Mary et al.² pour la même espèce incubée en eau distillée stérile. Par ailleurs, sur le plan d'expression de caractères biochimiques, nous avons noté un ensemble de modifications apparues suite aux différentes conditions de stress (fermentation de l'adipate et du caprate). Ces modifications sont variables selon le stress induit. En Tunisie, l'étude de Lakhil¹⁹, a démontré que de telles modifications surviennent chez *A. hydrophila* ayant séjourné dans différents types d'eau de mer. D'autres travaux ont mentionné

la perte du potentiel de métabolisation des sucres chez *S. paratyphi B*³¹. Pour les modifications du profil de résistance aux antibiotiques, il est certain que le séjour en différentes conditions de stress agirait négativement sur l'expression de caractères extrachromosomiques (plasmides, transposons). Selon Joux et al.³², les fractions UV des rayonnements solaires bloqueraient la synthèse d'ADN ce qui inhiberait l'expression de ces gènes ou de plasmides impliqués dans les caractères de résistance. Cette phototoxicité pourrait induire également des altérations au niveau de structures cellulaires et de transport membranaire favorisant la diffusion intracellulaire de l'antibiotique.

CONCLUSION

Aeromonas hydrophila incubée en différentes conditions de stress (eau de mer, eau minérale, eaux usées et exposées aux rayonnements solaires) acquiert la forme VNC. L'acquisition de cette adaptation physiologique est accompagnée par une altération cellulaire (intégrité membranaire) qui est plus importante après incubation en eau de mer en présence de rayonnements solaires. Le passage à ces formes de survie est marqué en plus de la perte de la cultivabilité par des modifications morphologiques, biochimiques et antibiologiques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Dr. Michael Engelbrecht Nielson qui nous a donné la souche d' *A. hydrophila* B₃ utilisée au cours de cette étude.

REFERENCES

- 1- **I. Kersters, L. Van Vooren, G. Huys, P. Janssen, K. Kersters et W. Verstraete** (1995). Influence temperature and process technology on the occurrence of *Aeromonas* species and hygienic indicator organisms in drinking water production plants. *Microb. Ecol.*, **30**, 203-218.
- 2- **P. Mary, N.E. Chihib, O. Charafeddine, C. Defives et J.P. Hornez** (2002). Starvation survival and viable but non culturable states in *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Ecol.*, **43**, 250-258.
- 3- **P. Messi, E. Guerrieri et M. Bondi** (2002). Survival of *Aeromonas hydrophila* in an artificial mineral water microcosm. *Wat. Res.*, **36**, 3410-3415.
- 4- **S. Maalej, R. Gdoura, S. Dukan, A. Hammami et A. Bouain** (2004). Maintenance of pathogenicity

- entry into and resuscitation from viable but non culturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 557-565.
- 5- **J.A. Santos, C.J. Gonzalez, A. Otero et M. Garcia-Lopez** (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5612-5617.
 - 6- **H. El Hili Attia, S. Khaled et M. El Bour** (1997). A propos des mortalités de poissons survenues dans le lac Ichkeul. *Revue de l'INAT*, 12pp.
 - 7- **K. Bouamama** (2001). *Mytilus galloprovincialis* de la lagune de Bizerte: populations bactériennes et biomarqueurs non spécifiques. Diplôme des études approfondies DEA, Faculté des sciences de Tunis, Institut des sciences et des technologies de la mer Salammbô (Tunisie), 60 pp.
 - 8- **M. Dallali** (2001). Utilisation d'indicateurs microbiologiques chez *Ruditapes decussates* et *Mytilus galloprovincialis* dans la biosurveillance de la lagune de Bizerte : validation de certains biomarqueurs. Thèse de doctorat, Faculté des sciences de Bizerte (Tunisie), 116 pp.
 - 9- **M. El Bour, H. Attia El Hilli, R. Mraouna et W. Ayari** (2001). Bacterial study of *mesophilic Aeromonads* distribution in Shellfish. Proceeding of the fifth international conference on the Mediterranean coastal environment. *MEDCOAST*, **1**, 557-565.
 - 10- **P. Monfort, et B. Baleux** (1999). Bactéries viables non cultivables: Réalité et conséquences. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **14**, 201-207.
 - 11- **Y.A. Chabbert** (1982). Sensibilité bactérienne aux antibiotiques. In *Bactériologie médicale* (Edited by L. Le Minor and M. véron), pp 205-212. Flammarion, Paris.
 - 12- **M. Hamze, F. Dabboussi et D. Izard** (1998). Sensibilité à 23 antibiotiques de 83 souches de *Aeromonas hydrophila* isolées d'eaux libanaises. *Cabier de l'Association Scientifique Européenne pour l'eau et la santé*, **3**, 91-96.
 - 13- **Société Française de Microbiologie** (1998). Comité de l'Antibiogramme. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **13**, 243-251.
 - 14- **M. Trousselier, M. Albat, A. Andre et B. Baleux** (1985). Dénombrement direct des bactéries dans les milieux aquatiques par microscopie en épifluorescence : distribution et précision des mesures. *Rev. Fran. Sc. Eau.*, **4**, 35-49.
 - 15- **P. Lebaron, P. Catala et N. Parhuisot** (1998). Effectiveness of SYTOX green stain for bacterial viability assessment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2697-2700.
 - 16- **P. Lebaron, M. Trousselier et P. Got** (1994). Accuracy of epifluorescence microscopy count for direct estimates of bacteria numbers. *J. Microbiol. Meth.*, **19**, 89-94.
 - 17- **A. Mahjoubi, S. Maalej, C. Elazri et A. Bakhrouf** (2001). Effet des facteurs environnementaux sur la survie des *Aeromonas spp.* Avant et après leur rejet en milieu marin. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, **36**, 196.
 - 18- **S. Maalej, S. Dukan et M. Denis** (2002). Etude par cytométrie en flux de la viabilité d'*Aeromonas hydrophila* en eau de mer naturelle stérile. 5^{èmes} journées tunisiennes des sciences de la mer (Ain Draham, 21-24 Décembre 2002), 42 pp.
 - 19- **F. Lakhel** (2003). Etude et suivi de la croissance d'*Aeromonas hydrophila* en eau de mer. Diplôme des études approfondies DEA, Faculté des sciences de Tunis, Institut des sciences et des technologies de la mer (Tunisie), 82pp.
 - 20- **M.H. Laaberki** (1999). Suivi d'*Aeromonas* isolés des milieux aquatiques et hospitaliers sous l'action des facteurs expérimentaux et naturels. Rapport de stage effectué à l'UMR. 5556 CNRS- Université Montpellier II cc93. Laboratoire d'écologie bactérienne des eaux, 30pp.
 - 21- **B. Baleux, A. Caro, J. Lesne, P. Got, S. Binard et B. Delpuech** (1998). Survie et maintien de la virulence de *Salmonella Typhimurium* VNC exposée simultanément à trois facteurs stressants expérimentaux. *Ocean. Acta.*, **6**, 939-950.
 - 22- **A. Caro, P. Got, J. Lesne, S. Binard et B. Baleux** (1999). Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3229-3232.
 - 23- **D.W. Warburton, K. John et B.B. Mc Cormick** (1994). Survival and recovery of *Aeromonas hydrophila* in water: development of methodology for testing bottled water in Canada. *Can. J. Microbiol.*, **40**, 145-148.
 - 24- **G. Brandi, M. Sisti, F. Giardini, G.F. Schiavano et A. Albano** (1999). Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas spp.* in different types of water. *Lett. Appl. Microbiol.*, **29**, 211-215.
 - 25- **J. Coallier, M. Prévost et A. Rompré** (1994). The optimization of two direct viable count methods

- for bacteria in distributed drinking water. *Can. J. Microbiol.*, **40**, 830-836.
- 26- **J. Ravel, I.T. Knight, C.E. Monahan, R.T. Hill et R.R. Colwell** (1995). Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microbiol.*, **141**, 377-383.
- 27- **A. Caro, P. Got, J. Lesne, S. Binard et B. Baleux** (1999b). Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3229-3232.
- 28- **M.M. Sevilla** (1999). Etude de la viabilité cellulaire de différentes souches d'*Aeromonas hydrophila* soumise à l'action du rayonnement solaire. Rapport de stage effectué à l'UMR 5556 CNRS-Université Montpellier II cc93. Laboratoire d'écologie bactérienne des eaux, 60pp.
- 29- **M.M. Lyons, P. Aas, J.D. Pakulski, L. Van Waasbergen, R.V. Miller, D.L. Mitchell et W.H. Jeffrey** (1998). DNA damage induced by ultraviolet radiation in coral-reef microbial communities. *Mar. biol.*, **130**, 537-543.
- 30- **G.W. Huisman, D.A. Siegele, M.M. Zambrano et R. Kolter** (1996). In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, eds (Washington, D.C.: American Society for Microbiology), 1672 pp.
- 31- **A. Bakhrouf et M. Jeddi** (1992). Modification des caractères cultureux et biochimiques du *Salmonella paratyphi B* après incubation dans l'eau de mer. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 871-874.
- 32- **F. Joux, W.H. Jeffrey, P. Lebaron et D.L. Mitchell** (1999). Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3820-3827.