

51 – Contribution à la bactériologie des eaux de fabrication de distilleries en Guadeloupe

GANOU-PARFAIT B., VALLADON M., PARFAIT A.
INRA, LAPRA, CRITT-BAC, Pointe à Pitre, Guadeloupe



Résumé

Les ressources en eau ont deux principales origines : les rivières et les nappes phréatiques. L'inventaire de la microflore bactérienne est orienté vers la recherche des germes pouvant avoir des conséquences en fabrication.

Plusieurs facteurs interviennent sur la composition quantitative et qualitative de la population bactérienne : les processus thermiques, les teneurs en minéraux et l'utilisation des antiseptiques. Des résultats sont fournis pour quelques sites industriels.

Mots-clés : distillerie, rhum, bactérie, eau, minéralisation, contamination, antiseptique.

Les distilleries de l'archipel guadeloupéen sont localisées dans trois îles : la Basse-Terre, la Grande-Terre et Marie-Galante. Les deux dernières sont caractérisées par un climat sec et un sol calcaire. La nappe phréatique et des petites rivières constituent la ressource propre en eau. La Basse-Terre est montagneuse et humide ; les eaux de surface sont plus abondantes.

Les eaux de fabrication ne sont pas traitées, elles apportent avec les matières premières, la majeure partie des germes de contamination. Pour assurer la protection des milieux fermentaires contre la prolifération et l'activité bactérienne, une acidification est provoquée par de l'acide sulfurique et certains antiseptiques à base de fluorure sont utilisés.

La flore bactérienne participe aussi à la formation de l'arôme.

Matériels et méthodes

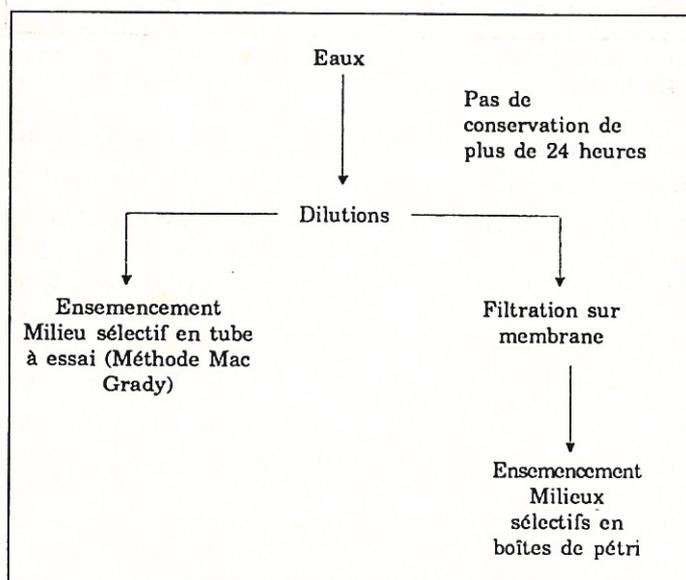


Figure 1 : Traitement des échantillons d'eau.

Des échantillons d'eau sont prélevés au niveau de l'alimentation du site industriel. L'opération s'est poursuivie durant deux campagnes, 1989 et 1990 pour une période allant de février à mai. Le schéma de traitement est celui de la figure 1. Les différents groupes de bactéries sont isolés à partir de milieux sélectifs (Tableau I). Les numérations de certaines bactéries anaérobies, dont les bactéries sulfato-réductrices sont faites suivant la méthode du nombre le plus favorable avec un coefficient de confiance de 95 % (ALEXANDER, 1982) et pour cela sur trois tubes par dilution.

Les autres bactéries sont dénombrées par la méthode de membranes filtrantes Sartorius. Les eaux sont diluées puis filtrées sur une rampe à filtration. Les membranes de filtration pour dénombrement en nitrate de cellulose ont une porosité de $0,2 \mu$ et sont ensuite appliquées sur le milieu gélosé en boîte de Pétri. L'incubation a lieu à 30°C pour les germes aérobies et en jarre gaspak à 30°C pour les germes anaérobies.

Le dosage des minéraux des échantillons d'eau a été réalisé par HPLC ; ceux-ci sont d'abord filtrés sous vide pour faciliter le dégazage. Après dilution, les échantillons sont clarifiés par passage sur des colonnes *Sep-pak*. Les anions sont séparés par passage sur une colonne Mitsubishi SCA 03 à température ambiante

Tableau I : Composition des milieux de culture.

Germes aérobies : a, b, c, d			
a) Eau physiologique : diluant aérobie		b) Milieu R2A (ANON, 1985 : American Public Health Association)	
NaCl :	8,5 g	Extrait de levure	0,5 g
Pastone :	1,0 g	Protéose peptone n° 3	0,5 g
Eau distillée :	1 000 ml	Casamino-acides	0,5 g
		Glucose	0,5 g
		Amidon soluble	0,5 g
		K ₂ PHO ₄	0,3 g
		Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,3 g
		Pyruvate de sodium	0,3 g
		Eau distillée	1 000 ml
		pH 7,2 avec K ₂ H PO ₄ pour KH ₂ PO ₄ Autoclaver à 120 °C pendant 15 mn	
c) Milieu leuconostoc		d) Milieu LBS pour <i>Lactobacillus</i>	
Tryptone	10,0 g	Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g	Extrait de levure	0,5 g
Sucrose	100,0 g	KH ₂ PO ₄	6,0 g
Citrate de sodium	1,0 g	Acétate de sodium, 8H ₂ O	25,0 g
D-Glucose	5,0 g	Acide acétique glacial	1,32 ml
Gélatine	2,5 g	Glucose	20,0 g
Eau distillée	1 000 ml	Tween 80	1,0 ml
		Solution de sels	5,0 ml
Stériliser à 121 °C pendant 15 mn. Le milieu complet doit contenir 0,75 % d'azothydrate de sodium par litre de milieu. Solution d'azothydrate de sodium à 1 %. Astériliser par autoclavage de 15 mn à 121 °C.		pH 5,4. Ne pas autoclaver. Stériliser par 50 mn d'ébullition à 100 °C Solution de sels :	
		Sulfate de manganèse	2,8 g
		Sulfate de magnésium	11,5 g
		Sulfate ferreux	0,68 g
		Eau distillée	1 000 ml
Germes anaérobies : a, b, c, d, e			
a) Diluant anaérobie		b) Milieu Van Niel modifié pour Propionibacterium	
NaCl	8,5 g	Extrait de levure	5 g
Na ₂ S, 9H ₂ O	0,15 g	Lactate de sodium	20 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	Cystéine HCl	0,5 g
Eau distillée	1 000 ml	Tween 80	0,5 g
		Agar	0,5 g
		Eau distillée	1 000 ml
pH 7,4. Répartir en tubes à vis stériliser.			
c) Milieu de Bryant et Burkey Pour <i>Clostridium</i> fermentant le lactate		d) Milieu PYG	
Tryptone	15,0 g	Peptone	10 g
Extrait de levure	5,0 g	Extrait de levure	10 g
Extrait de viande	7,5 g	Glucose	10 g
Acétate de sodium	5,0 g	Solution de sels	900 ml
Chlorhydrate	0,5 g	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,6 g
Résazurine	2,5 g	Résazurine	0,001 ml
Lactate de sodium en solution à 50 %	10,0 g	Cystéine-HCl	0,5 g
Eau distillée	1 000 ml	Théoglycolate de sodium	1 g
Agar	6,0 g	Eau distillée qsp	1 000 ml
		Agar	6 g
Stériliser à l'autoclave à 120 °C pendant 15 mn		pH final 6,8 à 7,0 Solution de sels en mg/l K ₂ H PO ₄ : 0,56 ; KH ₂ PO ₄ : 0,33 ; Na ₂ CO ₃ : 0,22 ; Mg SO ₄ 7H ₂ O : 0,11 ; (NH ₄) ₂ SO ₄ : 0,22 ; NaCl : 0,53 ; FeCl ₃ : 0,005	
e) Milieu de Postgate B pour BSR		Stériliser à 120 °C pendant 15 mn.	
KH ₂ PO ₄	0,5 g		
NH ₄ Cl	1,0 g		
CaCl ₂ , 6H ₂ O	1,0 g		
Na ₂ SO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g		
Lactate de sodium solution à 60 %	5,8 ml		
Extrait de levure	1,0 g		
Acide ascorbique	1,0 g		
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g		
Mg, SO ₄ , 7H ₂ O	2,0 g		

avec comme éluant le phtalate de potassium à pH supérieur à 8. Ils sont analysés sur le détecteur à UV universel JASCO 875 uv. Les cations sont séparés par passage sur une colonne Mitsubishi SCK 01 à température ambiante. L'éluant pour les alcalins est l'acide nitrique et pour les alcalino-terreux, l'acide tartrique additionné d'éthylène diamine. Ils sont détectés par un conductimètre WESCAM 215. La figure 2 représente des exemples de séparation. Les différents ions sont quantifiés et enregistrés grâce à l'intégrateur calculateur SIC : Chromato corder 12.

Résultats

Sur le plan bactériologique en rhumerie, on distingue les germes aérobies (bactéries lactiques, corynébactéries, *Bacillus*) davantage présents sur les milieux à base de jus de canne à sucre et les germes thermophiles et anaérobies (clostridies, *Bacillus*, bactéries sulfato-réductrices) plus abondants sur les milieux à base de mélasse (Tableau II). Des antiseptiques sont employés en distillerie pour limiter

Tableau II : Nombres moyens de bactéries dans les différents milieux de distillerie.

Bactéries	Eau	Jus de canne à sucre	Vin de jus de canne	Mélasse	Vin de mélasse
Aérobies totales	7×10	5×10	3×10	2×10	6×10
Aérobies sporulées	1×10	7×10	8×10	4×10^2	4×10
Anaérobies totales	2×10^3	3×10	3×10^2	3×10^2	2×10
Anaérobies sporulées	10^3	10	2×10^2	4×10^3	6×10
Leuconostoc	30	1×10	15.10	-	-
Lactobacillus	20	2×10^2	2×10	-	45.10^3
Bactéries sulfato-réductrices lactate*	30	15×10^2	non recherché	-	-

l'activité des bactéries. Le plus communément utilisé est l'acide sulfurique (41/100 hl) ; il permet d'abaisser le pH du moût à 4,5, mais augmente la concentration en ions sulfate du milieu fermentaire.

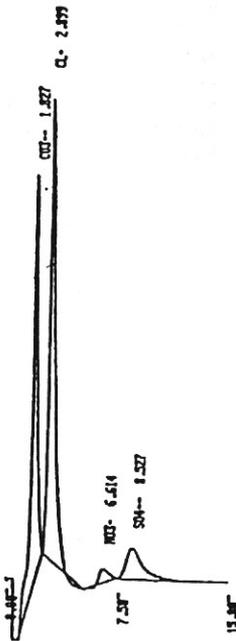
Il est possible que le métabolisme du soufre dans la levure et chez les bactéries (BSR) ait des conséquences sur la fraction aromatique du rhum et sur la qualité des vinasses, source de pollution sur l'environnement. D'autres antiseptiques ont été utilisés en Guadeloupe.

Assez souvent, outre la nécessité d'une adaptation des levures à ces antiseptiques, il se développe des bactéries résistantes.

Tableau III : Les eaux des rivières. Variation des teneurs en minéraux.

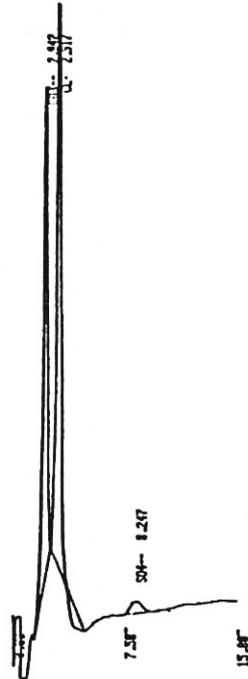
	Basse-Terre	Grande-Terre	Marie-Galante
Sodium	Teneurs stables : 11 mg/l en moyenne	En moyenne 6 mg/l. Les teneurs sont faibles à nulles sauf en fin de campagne où elles atteignent 13 mg/l	Teneurs : 20 à 40 mg/l. Nous observons une augmentation de l'ion sodium dans les réservoirs pour atteindre 33 à 59 mg/l
Calcium	Les teneurs sont élevées en début de campagne, 14 à 15 mg/l, puis elles chutent à 9 mg/l en moyenne en fin de campagne	Les teneurs sont fortes en début de campagne : 30 mg/l ; puis, elles diminuent : 20 mg/l, jusqu'en fin de campagne	La rivière renferme 146 mg/l en moyenne. Ces quantités diminuent lors du stockage. Cette diminution est plus importante de moitié dans les réservoirs en béton alors qu'elle varie de 15 à 30 mg/l dans le réservoir en acier
Magnésium	Traces	A l'état de traces	Teneurs : 10 à 20 mg/l. Elles sont stables dans le réservoir en acier, elles diminuent à 5 mg/l dans les réservoirs en béton
Chlorure	Les teneurs sont stables au cours de la campagne : 10 mg/l	Les teneurs sont stables en moyenne : 15 mg/l sauf en fin mars où elles chutent à 9 mg/l	Moyenne : 55 mg/l. On note une augmentation des teneurs dans les réservoirs de l'ordre de 100 à 150 mg/l
Nitrate	Absence	Absence	Absence
Sulfate	Le sulfate n'est détecté qu'en période pluvieuse 3 à 13 mg/l	Les quantités de sulfate dosées sont faibles à nulles sauf en début de campagne : 12 mg/l	L'eau de rivière recèle de faibles teneurs : 4 à 5 mg/l. Mais dans certains réservoirs on a trouvé jusqu'à 35 mg/l

SAMPLE 19 16:09 FEB. 06 1990



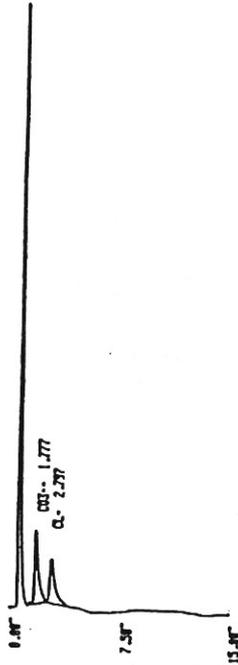
NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1	C03--	1.827	545214				545214.8836
2	CL--	2.899	598835				123.3884
3	PO4--	6.614	26076				26076.8071
4	NO3--	8.527	124348				37.8248
5	SO4--						
TOTAL							571452.8239

SAMPLE 18 15:23 FEB. 01 1990



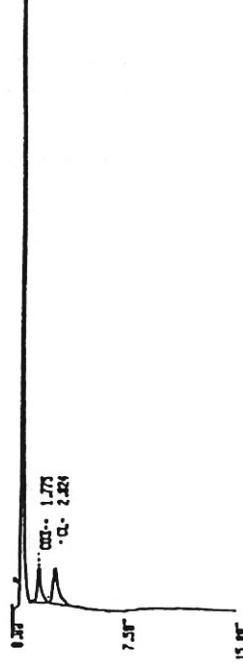
NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1	C03--	2.842	459648				459648.3926
2	CL--	2.917	576115				118.6382
3	PO4--	8.247	37353				11.3569
4	SO4--						
TOTAL							459778.3798

SAMPLE 12 14:03 FEB. 06 1990



NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1	C03--	1.777	67033				67033.4693
2	CL--	2.797	52919				18.8967
3	PO4--						
4	NO3--						
5	SO4--						
TOTAL							87964.3667

SAMPLE 04 10:46 FEB. 08 1990



NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1	C03--	1.773	32368				32368.3086
2	CL--	2.824	43958				9.8316
3	PO4--						
4	NO3--						
TOTAL							43958.1402

Figure 2 : Exemples de séparation de minéraux.

Des essais au laboratoire nous ont montré que les bactéries des milieux fermentaires rhumiers parviennent à croître en présence de concentration élevées de fluorure de sodium (0,28 g/l), d'acide de sodium, de chlorure de sodium et d'éthanol. Cela indique une adaptation des germes bactériens aux antiseptiques sodés, à l'éthanol (jusqu'à 8 ° GL généralement).

Nous avons étudié la variation des teneurs des eaux de fabrication en ions sodium, calcium, magnésium, chlorure, nitrate et sulfate et la variation de la flore bactérienne correspondante (Tableaux III, IV, V et VI).

Tableau IV : Variation de la flore bactérienne des eaux.

	Basse-Terre	Grande-Terre	Marie-Galante
Bactéries aérobies	En début de campagne février-mars, leur nombre est de l'ordre de 7.10^6 bactéries/ml d'eau puis il régresse et se stabilise jusqu'à la fin de la campagne à 6.10^3 bactéries/ml	En début de campagne on a pu détecter 1.10^3 aérobies/ml d'eau. Ce nombre reste stable au cours des campagnes sauf en avril où il augmente légèrement à 1.10^4 bactéries/ml	En mars, nous avons détecté 1.10^3 bactéries aérobies dans l'eau de la rivière. En avril elles sont de l'ordre de 15.10^4 en moyenne. Le stockage dans des réservoirs en béton montre une augmentation de la flore aérobie : 11.10^6 bactéries/ml d'eau en avril
Bactéries anaérobies	Les pluies du mois d'avril semblent favoriser le nombre de bactéries anaérobies, généralement stable au cours de campagne. La population passe de 1 à 6.10^3 à 1 à 5.10^5 bactéries/ml	L'eau renferme peu de bactéries anaérobies en début de campagne : 1.10^2 bactéries/ml en 1989, 2.10^4 bactéries/ml en 1990. Nous avons détecté des périodes de plus fortes contaminations comme en mars 1989 (Pâques) : 2.10^4 bactéries. A la fin de la campagne de 1990, le nombre d'anaérobies a atteint 5.10^4 bactéries /ml	Nous avons observé une augmentation de la flore anaérobie dans le temps durant les campagnes, elle est passée de 10^2 à 10^4 bactéries/ml d'eau. Cependant, le nombre a augmenté dans la profonde cuve en acier alors qu'il a régressé dans les réservoirs, les bassins en béton très larges et peu profonds : 50 à 100 bactéries/ml
Bactéries sporulées	Le nombre de bactéries sporulées régresse du début à la fin de la campagne. Il passe de 10^3 à 10^1 bactéries pour les anaérobies et de 6.10^2 pour les aérobies	Leur population diminue au cours des campagnes. Les sporulées anaérobies restent peu nombreuses : 4 à 7.10^1 et ne sont pas retrouvées en fin de campagne. Les aérobies sporulées sont plus rares. Nous observons un maximum en avril de l'ordre de 10^1 bactéries/ml	Les bactéries anaérobies sporulées restent rares dans les eaux. Leur nombre avoisine 6 à 10 dans les réservoirs. Les bactéries aérobies sporulées voient leur nombre augmenter en avril et passent de 10 bactéries/ml à 1.10^6 bactéries/ml
Bactéries sulfato-réductrices	Les premiers mois de la campagne industrielle ont permis de dénombrer 1 à 2.10^2 bactéries/ml. Ce nombre de bactéries évolue en régressant les mois suivants jusqu'à s'annuler en fin de campagne	Les bactéries sont en général en faible quantité sauf aux périodes de fortes contaminations (mars 1989 par exemple) : 10^1 à 2.10^3 bactéries/ml. En fin de campagne, on n'en détecte plus.	Leur population est en général inexistante sauf en avril : 10.10^2 bactéries/ml. A cette même époque leur nombre est, dans le réservoir en acier, de 2.10^2 bactéries/ml

Selon la localisation géographique et le type d'eau, nous notons d'assez grandes différences entre les eaux de dilution des matières premières de distillerie.

Les eaux de nappe phréatique de Grande-Terre, comme de Marie-Galante sont en contact avec l'eau de mer à certaines périodes de l'année. Cela explique sans doute les fortes teneurs en chlorure, sodium et sulfate de ces eaux. Les eaux de puits de Marie-Galante présentent de plus grandes quantités d'ions sodium, calcium, magnésium, chlorure et sulfate que l'eau de puits de Grande-Terre. Celle-ci renferme en plus du nitrate.

Tableau V : Variation des teneurs en minéraux dans les eaux de puits.

	Basse-Terre	Grande-Terre	Marie-Galante
	Pas de puits		
Sodium		Les teneurs en sodium sont toujours élevées, de l'ordre de 100 à 155 mg/l tout au long des campagnes	L'usine à sucre possède deux puits, la distillerie prospectée n'en a qu'un. Ces eaux de puits se caractérisent par une forte teneur en ion sodium : 155 à 180 mg/l. Ces quantités sont cinq fois moindre dans le réservoir en ciment de l'usine.
Calcium		Les quantités d'ion calcium sont importantes en début de campagnes : 100 à 200 mg/l en 1989, 170 à 400 mg/l en 1990. Puis, elles chutent ensuite à 50-70 mg/l jusqu'en fin de campagne	Les teneurs sont élevées : 100 à 250 mg/l, mais la quantité d'ion de calcium a diminué dans le réservoir en ciment de l'usine qui stocke une eau de puits : 79 mg/l
Magnésium		Les teneurs en magnésium ne varient guère au cours des campagnes : 11 mg/l	Les eaux de puits renferment 30 à 40 mg/l de magnésium. Dans l'eau du réservoir, nous n'avons trouvé que 9 mg/l
Chlorure		Nous observons peu de variation au cours des campagnes sauf en mars 1989 : 27 mg/l et avril 1990 : 90 mg/l. Autrement les teneurs en chlorure sont toujours les plus élevées parmi les minéraux. Elles sont supérieures au sodium : 120 à 270 mg/l	Les ions chlorure sont en quantité supérieure au sodium : 200 à 400 mg/l. Cependant, nous constatons une teneur beaucoup plus faible dans le réservoir de l'usine de l'ordre de 85 mg/l
Nitrate		Nous notons la présence d'ion nitrate dans cette eau : 25 à 35 mg/l	Absence
Sulfate		Les teneurs au cours des campagnes sont stables : 40 mg, sauf en fin de campagnes où elles atteignent 50 mg/l	Dans l'eau de la distillerie, nous trouvons 20 mg/l Dans les eaux de l'usine à sucre 65 à 80 mg/l. Cette teneur diminue nettement dans le bassin 10 mg/l

Tableau VI : Variation de la flore bactérienne des eaux de puits.

	Basse-Terre	Grande-Terre	Marie-Galante
	Pas de puits		
Bactéries aérobies		On constate une assez forte augmentation de leur nombre dès la fin mars. On passe de 10^3 à 10^6 bactéries/ml en avril. Les campagnes se terminent avec 10^6 bactéries/ml	La flore aérobie oscille entre une population de 10^4 et 10^5 bactéries/ml
Bactéries anaérobies		Les bactéries anaérobies sont peu nombreuses en début des campagnes : 10^2 bactéries/ml d'eau. Elles atteignent 10^5 bactéries/ml en avril et se stabilisent ensuite à 10^4 bactéries/ml	Les eaux de puits renferment en général 10^4 bactéries anaérobies/ml d'eau. Dans le bassin de stockage, nous avons dénombré 10^6 bactéries anaérobies/ml d'eau
Bactéries sporulées		Leur nombre augmente à la fin de mars et ceci est très net en avril. Ainsi les bactéries aérobies sporulées passent de 10^1 bactéries à $6 \cdot 10^3$ bactéries/ml ; les anaérobies sporulées passent de 10^1 à 10^5 bactéries/ml en avril et se stabilisent ensuite à 10^4 bactéries/ml	Les bactéries aérobies sporulées peu nombreuses subissent une augmentation dans le réservoir de l'usine et passent de 6 bactéries/ml à 130 bactéries/ml d'eau. On observe une certaine équivalence du nombre de bactéries anaérobies sporulées dans les différentes eaux de puits : 60 bactéries/ml, même dans l'eau du réservoir en ciment
Bactéries sulfato-réductrices (BSR)		Nous avons dénombré peu de BSR durant le premier trimestre, puis il s'est produit une augmentation en avril. De 60 bactéries/ml, nous sommes passés à 300 bactéries/ml	Certaines eaux de puits sont plus contaminées que d'autres. Le stockage semble favoriser une multiplication des BSR : 6 bactéries/ml deviennent $7 \cdot 10^4$ bactéries/ml d'eau

Les eaux de surface sont moins minéralisées que les eaux de puits. L'eau de réserve de la Grande-Terre est équivalente minéralement à celle de la Basse-Terre ; c'est en effet de celle-ci qu'est acheminée l'eau d'irrigation de la Grande-Terre.

Les flores bactériennes des eaux de surface de Basse-Terre, de Grande-Terre et de Marie-Galante présentent des similitudes ; cependant, nous remarquons que l'eau d'irrigation de la Grande-Terre est un peu plus riche en bactéries anaérobies et en bactéries sulfato-réductrices.

L'eau de rivière de Marie-Galante voit sa flore varier quantitativement lorsqu'elle est stockée. Les bassins en maçonnerie semblent favoriser une augmentation de la flore bactérienne surtout s'ils sont peu entretenus et profonds.

Les eaux de puits de Marie-Galante sont plus contaminées que l'eau de puits de Grande-terre ; seule la population de bactéries sporulées apparaît plus nombreuse dans l'eau de Grande-Terre.

Tous ces résultats montrent qu'il existe une certaine relation entre la minéralisation des eaux de fabrication et leur population bactérienne. Les eaux de puits qui renferment des concentrations élevées en minéraux sont plus contaminées par les bactéries que les eaux de surface. Il est difficile d'affirmer que tel ou tel ion est responsable de la variation de la population de tel ou tel groupe bactérien pour l'instant. Nous avons simplement constaté par exemple que dans les eaux saumâtres des nappes phréatiques étaient présents des groupes de BSR dont une à tendance halophile et que dans certaines eaux la diminution dans le temps de concentration en ions sulfate correspond à une augmentation du nombre de BSR.

Bibliographie

ALEXANDER M., 1982. Most probable number method for microbial population. Methods of soil analysis part 2. Chemical and Microbiological properties. Agronomy mono graph n° 9 (2^e édition), p. 815-820

ANON, 1985. Standards methods for the examination of water and wastewater 16th ed. Washington D.C. American Public Health Association.