



HAL
open science

Analyse fine et stabilisation des hydrolats de rose et de fleur d'oranger

Cécile Labadie

► **To cite this version:**

Cécile Labadie. Analyse fine et stabilisation des hydrolats de rose et de fleur d'oranger. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT039 . tel-01541509

HAL Id: tel-01541509

<https://theses.hal.science/tel-01541509>

Submitted on 19 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ALBERT VIEILLE

Essentials. It's in our nature!



Délivrée par **l'Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale « SP-SA » ED 306

Et de l'UMR 408 - INRA

« Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale »

Spécialité : **Biochimie, Chimie et Technologie des aliments**

Présentée par

Cécile Labadie

Analyse Fine et Stabilisation des Hydrolats de Rose et de Fleur d'Oranger

Soutenue le **4 Décembre 2015** devant le jury composé de :

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET, Professeur	AgroParisTech	Rapporteur
M. Alain MUSELLI, Professeur	Universita di Corsica Pasquale Paoli	Rapporteur
M. Cédric SAUCIER, Professeur	Université de Montpellier	Examineur
Mme Céline CERUTTI, Docteur	Albert Vieille	Examineur
Mme Catherine RENARD, Directeur de recherche	INRA UMR408	Examineur
M. Frédéric CARLIN, Directeur de recherche	INRA UMR408	Directeur de thèse



“L’imagination est plus importante que le savoir.”

Albert Einstein

*« En essayant continuellement, on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chances
que ça marche »*

Devise Shadok

Sommaire

Remerciements.....	10
1. INTRODUCTION	13
1.1. Contexte du projet.....	14
1.2. Les collaborateurs du projet.....	15
1.2.1. La société Albert Vieille SAS	15
1.2.2. L'INRA Avignon « Sécurité et qualité des produits d'origine végétale »	17
2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	19
2.1. Description des hydrolats	20
2.1.1. Une production entre artisanat et modernité	20
2.1.1.1. Un peu d'histoire	20
2.1.1.2. Les procédés de distillation	21
2.1.1.3. Impact du procédé sur le distillat.....	23
2.1.1.4. Les campagnes de production.....	24
2.1.2. Différents modes de stockage et de distribution.....	28
2.1.3. Composition chimique des hydrolats.....	28
2.1.3.1. Biosynthèse des composés volatils chez les plantes.....	29
2.1.3.2. La répartition des composés volatils dans le distillat	33
2.1.4. Propriétés et réglementation.....	35
2.2. Des microorganismes dans les hydrolats	36
2.3. Des microorganismes capables de métaboliser les composés volatils	39
2.3.1. Métabolisation des composés volatils	39
2.3.1.1. Métabolisation des monoterpènes.....	39
2.3.1.2. Métabolisation des sesquiterpènes	44
2.3.1.3. Métabolisation du 2-phényléthanol	44
2.3.1.4. Métabolisation et dégradation de l'antranilate de méthyle	44
2.3.2. Impact sur les notes aromatiques.....	45
2.4. La microflore des produits aqueux pauvres en nutriments	46
2.4.1. Introduction.....	46
2.4.2. Des analyses microbiologiques spécifiques à ces environnements.....	48
2.4.2.1. Les techniques de dénombrement sur milieu de culture gélosé.....	48
2.4.2.2. Les méthodes de dénombrement et d'identification sans culture.....	49
2.4.2.3. Les méthodes permettant un dénombrement et une identification optimale.....	53

2.4.3.	Facteurs de survie et de croissance des microorganismes dans ces produits.....	53
2.4.4.	Un lien entre les populations microbiennes et la composition en nutriments ...	55
2.4.4.1.	Compositions chimiques	55
2.4.4.2.	Population microbiennes adaptées à ces milieux et impacts	56
2.4.1.	Incidents sanitaires.....	62
2.4.1.	Les réglementations et la stabilisation de ces produits.....	62
2.4.1.1.	Les eaux en bouteille.....	62
2.4.1.2.	Les boissons non alcoolisées	64
2.5.	Une stabilisation des hydrolats qui doit préserver leur finesse	65
2.5.1.	Les conservateurs actuellement utilisés pour la stabilisation des hydrolats.....	65
2.5.2.	Les conservateurs autorisés dans les produits cosmétiques	66
2.5.2.1.	Le 2-phénoxyéthanol.....	66
2.5.2.2.	La chlorphénésine	67
2.5.2.3.	Le bronopol	68
2.5.2.4.	L'isothiazolinone.....	69
2.5.2.5.	Les parabènes.....	71
2.5.2.6.	L'alcool benzylique	72
2.5.2.7.	L'extrait de pépins de pamplemousse	72
2.5.2.1.	L'éthanol.....	73
2.5.3.	Les autres conservateurs.....	73
2.5.3.1.	Les extraits végétaux, des composés actifs naturels	73
2.5.3.2.	Les acides organiques.....	81
2.5.3.3.	Les peptides antimicrobiens	86
3.	PROBLEMATIQUE.....	87
4.	MATERIEL ET METHODES	91
4.1.	Origine des échantillons d'hydrolats analysés	92
4.2.	Milieux de culture utilisés	92
4.3.	Analyse de la composition chimique et microbiologique des hydrolats.....	94
4.3.1.	Analyses chimiques	94
4.3.1.1.	Extraction, identification et quantification des composés volatils	94
4.3.1.2.	Détermination du pH	95
4.3.1.3.	Détermination de la concentration en glucides.....	95
4.3.1.4.	Détermination de la concentration en acides aminés.....	96
4.3.1.5.	Distillation de solutions de composés non-volatils en laboratoire.....	96

4.3.1.6.	Analyse des composés non volatils dans les hydrolats avant et après contamination	97
4.3.1.7.	Analyse de l'espace de tête (Head space).....	99
4.3.2.	Analyses microbiologiques.....	99
4.3.2.1.	Dénombrement de la microflore présente sur les fleurs fraîches de rose	99
4.3.2.2.	Recherche des conditions de culture adaptées aux bactéries présentes dans les hydrolats	100
4.3.2.3.	Dénombrement microbiologique et évolution de la population.....	100
4.3.2.4.	Isolement et identification des bactéries.....	100
4.3.2.5.	Evolution du profil volatil des hydrolats contaminés par certaines bactéries	104
4.3.3.	Analyse statistique	105
4.4.	Stabilisation des hydrolats	105
4.4.1.	Comportement de microorganismes pathogènes et d'altération dans les hydrolats	105
4.4.1.1.	Souches bactériennes utilisées	105
4.4.1.2.	Hydrolats utilisés	106
4.4.1.3.	Inoculation de microorganismes pathogènes et d'altération dans les hydrolats	106
4.4.2.	Comportement des souches bactériennes isolées des hydrolats sous différentes conditions de pH et de température.....	107
4.4.3.	Effet de différents conservateurs sur les microorganismes capables de se multiplier dans les hydrolats.....	108
4.4.3.1.	Sélection des conservateurs.....	108
4.4.3.2.	Effet des conservateurs testés sur les bactéries, en milieu de culture PCB10	109
4.4.3.3.	Effet des conservateurs sur un mélange bactérien dans les hydrolats	110
5.	RESULTATS.....	111
5.1.	Les hydrolats, des produits sensibles aux contaminations microbiennes.....	112
5.1.1.	Recherche de conditions de culture adaptées.....	112
5.1.2.	Une microflore capable de se multiplier dans les hydrolats.....	113
5.1.2.1.	Objectifs de l'étude	113
5.1.2.2.	Stratégie	113
5.1.2.3.	Résultats et discussion	114
5.1.2.4.	Conclusion de l'étude.....	117

Abstract	120
Introduction.....	121
Materials and Methods.....	122
Results and discussion.....	129
Conclusion	140
Acknowledgments.....	140
5.1.3. Résultats complémentaires : suivi d’une troisième campagne de production d’eau de rose de mai.....	141
5.1.4. Production et métabolisation des composés non volatils par les bactéries	142
5.1.4.1. Eau de fleur d’oranger.....	142
5.1.4.2. Eau de rose de mai	144
5.1.5. Analyse de l’espace de tête (Head space) par chromatographie gazeuse	145
5.1.6. Highlights.....	146
5.1.6.1. La composition chimique des hydrolats.....	146
5.1.6.2. La contamination microbienne des hydrolats	146
5.1.6.3. L’impact des microorganismes.....	147
5.2. Stabilisation des hydrolats	148
5.2.1. Comportement et contrôle de bactéries pathogènes et d’altération dans les hydrolats de fleur d’oranger et de rose	148
5.2.1.1. Objectifs de l’étude	148
5.2.1.2. Stratégie	148
5.2.1.3. Résultats et discussion	149
5.2.1.4. Conclusion de l’étude.....	152
Introduction.....	154
Material and methods.....	155
Results and discussion.....	161
Conclusion	174
5.2.2. Résultat complémentaire.....	175
5.2.2.1. Essai d’un extrait de romarin	175
5.2.2.2. Impact du milieu de culture sur le comportement d’un mélange bactérien soumis à différents antimicrobiens.....	176
5.2.3. Highlights.....	179
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	181
7. ANNEXE.....	187
8. LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	191

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197
10. VALORISATIONS DU TRAVAIL DE THESE	213
10.1. Poster.....	215
10.2. Communiqué de presse	217
10.3. Communication orale	220

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Florence Dubois-Brissonnet et Alain Muselli d'avoir accepté de juger le travail de ces 3 années de thèse, ainsi que Cédric Saucier. Je remercie également Catherine Renard de m'avoir accueillie au sein du laboratoire SQPOV.

Je voudrais remercier chaleureusement mon directeur de thèse Frédéric Carlin pour m'avoir donné l'opportunité de participer à ce projet de thèse dès sa conception et de m'avoir ouvert les portes du monde des bactéries moi qui n'étais pas microbiologiste. Mais également pour m'avoir suivie, supportée et parfois consolée pendant ces années (même si pour ça il a fallu supporter votre humour !). Merci aussi de m'avoir donné assez de liberté pour me rendre autonome, d'avoir été à l'écoute mais également de bon conseil quand il le fallait.

Je remercie tout particulièrement Céline Cerutti pour sa disponibilité, sa réactivité, et sa gentillesse. Pour tous les échanges que nous avons eus et qui ont grandement participé à l'aboutissement de ce travail. Je me souviendrai toujours du fournisseur mystère de Nabeul, du mormon danseur fou et du chat noir que tu es en voyage. Merci pour ces moments.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui m'ont accueillie au sein de l'entreprise Albert Vieille, et notamment Elise Carenini, Gérard Gatt, et Georges Ferrando. Je tiens aussi à remercier l'Unité NORT (Marseille) de m'avoir permis de mettre au point certaines méthodes analytiques au sein de leur laboratoire.

Merci aussi à Marie-Hélène Guinebretière et Christian Giniès pour leurs conseils précieux et le partage de leurs connaissances. Je pense également à toute l'équipe du laboratoire SQPOV, pour ces années passées ensemble, et cette ambiance de travail que je regretterai sûrement.

A Stéphanie Oriol qui aura été plus qu'un soutien pendant cette thèse. Merci pour ta douceur et ton enthousiasme à toute épreuve. A Alizée, Tic, Super Itriche, Dark Zézé.... Ma compagne de bureau avec qui j'ai mangé tellement de sucreries. Nous aurions dû être obèses. A Christelle ma collègue de galère... on l'aura mérité notre restau ! Courage ! (spéciale dédicasse à *H. pilori*). A Béné, et Véro, et à tous ceux qui ont participé au bon déroulement de cette thèse.

A tous ceux qui ont partagé l'open space des thésards, je pense notamment à Hélène, Clément, Benoit, Amina, et tous les thésard(e)s et stagiaires qui sont passés par là... A Claire

Dargaignaratz pour son naturel, sa bonne humeur et sa franchise. Merci d'avoir parfois sauvé mes petites bêtes.

A David Page pour m'avoir ouvert la porte de l'Inra, finalement je te dois un peu cette thèse ! Je te remercie pour ta bonne humeur et cette ambiance de franche camaraderie qui régnait dans le bureau, un petit big up à Marcel. A papi, Jean-François, qui a toujours su trouver une phrase lourdingue pour me faire rire, et à son grand cœur (c'est peu de le dire). A Aurélie parce que c'est toujours sympa de venir tailler une bavette dans ton bureau ! A Arnold, Belen, Sam, Kamran, et tout autre lanceur de frisbee, ou coureur « gaineur » du midi.

A Guiblon pour ta bienveillance et ton amitié qui me tient à cœur. A Caro Pawlowski (je l'ai bien écrit ?) d'avoir été ma coach congrès ! Je me mets même à regretter ta sonnerie de téléphone des fois. A Sabine pour ton soutien, ta présence et ton sacré caractère. A La Badard et son agriculteur, j'espère que les pâtisseries du pot de thèse seront bonnes, pour toute réclamation, merci de vous adresser à elle. Merci pour les bons moments passés ensemble, pourvu que ça dure ! A nous les cévennes... A Raph et Marie, pour leur sympathie, leur naturel et leur dynamisme. J'espère avoir encore l'occasion de randonner avec vous, sans noix de cajou. A Marcel Cerpieds, ou Jeff Caboche, et oui ça y est ma thèse se termine, mais je n'aurai pas fait de tomates carrées, de toute façon je ne travaille PLUS sur les tomates ! A Caro et Nono, non l'aquagym n'est pas un sport de vieux. Promis on achète les palmes. Merci pour votre énergie.

A ma cousine pour tout ce qu'elle représente, et à mon père pour son bouquet de roses. Merci de m'avoir encouragée et soutenue pendant cette période. A tous ceux que je n'ai pas cités ici mais qui ont influencé mes choix depuis petite, qui ont toujours fait partie de ma vie, Mapqm, les amolois, les palois, et les parisiens...

A ma mère qui a fait en sorte que j'en sois là aujourd'hui, et à Pierre-Michel. Vous avez toujours tenu la barre, dans les bons et les mauvais moments. Vous avez été, et vous êtes, de vrais piliers. Merci pour tout.

The last but not least, à Raphaël. Parce que tu as fait en sorte que tout se passe bien, parce que dans chaque épreuve tu me prouves un peu plus que dans la vie « on n'est pas toujours tout seul ». Et même si la vie nous réserve son lot de surprises, j'espère que nous suivrons toujours le même chemin.

A mon frère

1. Introduction

Cette thèse est un projet de recherche collaborative (2012 – 2015) entre la société Albert Vieille SAS (Vallauris, 06) et l'UMR-408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale du centre de recherche INRA PACA (Avignon, 84).

1.1. Contexte du projet

Les huiles essentielles et les hydrolats (ou eaux florales) sont des matières premières aromatiques naturelles, utilisées en agroalimentaire, pharmacie et cosmétique. Le processus de distillation des plantes aromatiques par entraînement à la vapeur engendre la formation de deux phases : une huile essentielle, le plus souvent surnageante et contenant les composés aromatiques en grande concentration, et une phase aqueuse dans laquelle est solubilisée une petite partie de l'huile essentielle. A titre d'exemple, l'eau de fleur d'oranger doit contenir, selon le Codex Alimentarius, au minimum 0,3 g d'huile essentielle par litre ; une eau jugée de bonne qualité en contient entre 0,5 à 0,6 g par litre. Le seuil de concentration de l'huile essentielle dans l'eau est limité. Au-delà d'une certaine concentration, l'eau est saturée et on observe une séparation de phase par décantation.

En fin de distillation, les huiles essentielles sont séparées des hydrolats par décantation et certains hydrolats obtenus sont ensuite soumis à une filtration stérilisante (filtres de porosité 0,22 μm) permettant aux produits de répondre aux critères d'hygiène requis. Ces hydrolats sont ensuite entreposés dans des conteneurs de grand volume (> 1000 L). Certains lots sont sujets à des contaminations microbiennes les rendant impropres à leur utilisation cosmétique ou agroalimentaire. Ces lots contaminés nécessitent une redistillation, qui augmente donc le coût et modifie les propriétés organoleptiques.

La Pharmacopée est un ouvrage réglementaire écrit par l'Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), à portée nationale et européenne, définissant les bonnes pratiques d'utilisation et d'analyse des produits destinés à la fabrication des médicaments. « Ces textes font autorité pour toute substance ou formule figurant dans la pharmacopée : ils constituent un référentiel opposable régulièrement mis à jour » (ANSM 2012). D'après la pharmacopée, les hydrolats peuvent contenir certains conservateurs antimicrobiens. Ces stabilisants doivent être solubles dans l'eau, inodores, incolores et conformes à l'utilisation cosmétique et/ou alimentaire. Actuellement, seuls les conservateurs synthétiques, tels que les parabènes, ou les isothiazolinones, permettent de répondre aux exigences sanitaires mais au détriment du statut « naturel » des hydrolats. Aujourd'hui la société Albert Vieille utilise des stabilisants compatibles avec les exigences de la certification biologique et de l'utilisation alimentaire comme par exemple l'acide citrique, le benzoate de sodium ou le sorbate de potassium. D'autres molécules ou mélanges de

molécules issus de synthèses (parabènes, bronopol, 2-phénoxyéthanol, isothiazolinone et chlorphénésine) sont également employés pour les produits à usage cosmétique selon les demandes des clients de la société.

Outre les problèmes liés à la réglementation qui vise à interdire un certain nombre de molécules à potentiel cancérigène, tels que les parabènes et le 2-phénoxyéthanol (Boberg, Taxvig *et al.* 2010), il n'est pas rare de constater une interaction entre le composé utilisé comme stabilisant et les hydrolats. Par exemple l'acide citrique modifie les qualités olfactives des eaux de rose (Société Albert Vieille, données non publiées). De plus, l'efficacité de ces conservateurs dans les hydrolats n'est pas connue.

L'objectif de ce projet est donc d'apporter une meilleure connaissance de la composition des hydrolats et de ses contaminants, dans le but de proposer une méthode de stabilisation adaptée et pérenne.

Pour cela, nous ferons dans un premier temps un point sur l'état de l'art. Ainsi, nous décrirons les hydrolats, leurs procédés de production, et leurs propriétés organoleptiques. Nous parlerons des microorganismes identifiés dans les hydrolats. Nous évoquerons ensuite l'impact de différents microorganismes sur les composés aromatiques. Puis nous tenterons de faire un lien entre la composition d'un milieu aqueux et sa microflore. Enfin, nous évoquerons les techniques actuelles de stabilisation des hydrolats et nous décrirons les conservateurs potentiels.

Dans un deuxième temps, nous décrirons le matériel et les méthodes utilisés lors de cette étude.

Enfin, dans un troisième temps, nous verrons les résultats obtenus lors de cette étude, permettant de mieux connaître la composition chimique et le microbiote des hydrolats, ainsi que l'efficacité des conservateurs testés. Ces résultats nous permettront ainsi de discuter des points à approfondir afin d'améliorer la connaissance de ces produits, et des méthodes de stabilisation envisageables.

1.2. Les collaborateurs du projet

1.2.1. La société Albert Vieille SAS

Fondée en 1920, l'entreprise familiale prend le nom d'Albert Vieille en 1968. Elle est spécialisée dans la production et la distribution de matières premières aromatiques destinées aux secteurs de la parfumerie, de la cosmétique, de l'aromathérapie, de la

pharmacie et de l'agro-alimentaire. La société Albert Vieille propose ainsi des absolues et concrètes, des hydrolats (ou eaux florales), des extraits au fluide supercritique (CO₂), des résinoïdes et des huiles essentielles et végétales (Encadré 1). L'entreprise ne commercialise pas de produits issus de la synthèse. Toutes les matières premières commercialisées sont issues de plantes botaniquement définies, de qualité reconnue et traçables auprès des producteurs. La société Albert Vieille s'engage dans la normalisation en ayant une participation active au sein de la commission « Huile essentielle » de l'AFNOR. Elle est membre du groupe de travail « Huiles essentielles » de la pharmacopée française qui élabore des monographies sur les matières premières à usage pharmaceutique. Ses objectifs futurs sont de mettre en place des filières équitables. C'est avec la même philosophie, que la société souhaite optimiser les rendements énergétiques, en eau et en CO₂, de ses procédés de transformation pour limiter leur empreinte environnementale. Aussi, des programmes de recherche sont menés sur l'utilisation de solvants alternatifs, moins toxiques, biodégradables, et/ou agrosourcés, ainsi que sur la valorisation des déchets pour le site de production. Et c'est dans cette démarche que s'inscrit le projet de recherche d'une stabilisation naturelle et adaptée des hydrolats.

Encadré 1 Lexique des matières premières aromatiques

Les produits aromatiques utilisés lors de cette thèse sont les suivants:

L'hydrolat est obtenu après entraînement à la vapeur de fleurs fraîches ou de plantes aromatiques, après séparation de l'huile essentielle.

L'eau florale est un hydrolat issu uniquement de la distillation de fleurs fraîches.

L'huile essentielle est obtenue après entraînement à la vapeur de fleurs fraîches ou de plantes aromatiques. Elle n'est pas miscible à l'eau et peut être séparée de l'eau florale par simple décantation.

Mais il existe bien d'autres matières premières aromatiques, que nous n'aborderons pas ici:

La concrète est obtenue après extraction par solvant (généralement l'hexane) de fleurs fraîches ou de plantes aromatiques. Le solvant est ensuite totalement éliminé par évaporation.

Un résinoïde est obtenu après extraction par solvant (en général l'éthanol) de fleurs ou de plantes aromatiques sèches.

L'absolue est obtenue après extraction à l'éthanol, et souvent à chaud, d'une concrète, d'un résinoïde ou d'un extrait au fluide supercritique. L'extrait alcoolique est ensuite refroidi et filtré puis l'éthanol est évaporé totalement.

L'extrait au fluide supercritique est une extraction de fleurs ou de plantes aromatiques généralement effectuée avec du CO₂ au stade supercritique, c'est à dire sous des paramètres de pression ou de température dépassant les points critiques de transition de phase. C'est un état de la matière lui procurant des propriétés physiques intermédiaires entre les gaz et les liquides. Pour le CO₂, les paramètres critiques sont T_c = 31 °C pour une pression P_c = 73,8 bar. Sous cette forme, le CO₂ est un solvant apolaire ou peu polaire permettant une extraction aisée des composés volatils. Une simple dépressurisation permet ensuite d'évaporer le CO₂ qui revient sous forme de gaz et se sépare naturellement de l'extrait.

1.2.2. L'INRA Avignon « Sécurité et qualité des produits d'origine végétale »

Deux équipes de l'UMR 408 de l'INRA d'Avignon, Sécurité Microbiologique des Aliments (animation : Frédéric CARLIN) et Qualité et Procédés (animation : Catherine Renard) sont impliquées dans le projet en raison de la nécessaire mise en œuvre de compétences en microbiologie et en chimie-biochimie des produits d'origine végétale destinés à l'alimentation. L'équipe « sécurité microbiologique des aliments » a pour objectif l'appréciation du risque microbiologique dans la chaîne de production alimentaire, sur l'ensemble de la filière, de la production des matières premières au consommateur. Elle recherche comment des microorganismes peuvent survivre et s'adapter aux pratiques de production des aliments. En outre des voies d'amélioration de la qualité microbiologique des produits destinés à l'alimentation sont recherchées en relation avec les professionnels des industries alimentaires. C'est dans ce cadre qu'est mise en place la collaboration avec la société Albert Vieille. L'équipe « Qualité et Procédés » s'intéresse à l'évolution des micro-constituants des fruits et légumes au cours de procédés de transformation. Des voies d'amélioration de la qualité nutritionnelle (et sensorielle) des fruits et légumes destinés à la conservation en frais ou à la transformation sont mises en place avec des partenariats industriels. Dans ce projet conduit avec la société Albert Vieille, l'équipe apporte son expertise de l'analyse des composés volatils, des composés du métabolisme secondaire des produits végétaux, ainsi que de la caractérisation des macro-constituants des matières premières végétales.

2. Synthèse bibliographique

2.1. Description des hydrolats

Les hydrolats sont des produits issus de la distillation (hydrodistillation ou entraînement à la vapeur) de fleurs ou de plantes aromatiques. Ils sont également appelés « eaux florales » lorsqu'il s'agit de distillation de fleurs. Dans ce mémoire, les termes « hydrolat » et « eau florale » désigneront les mêmes produits. Ils sont majoritairement utilisés en agroalimentaire notamment pour la conception de pâtisseries autour du bassin méditerranéen, en cosmétique, en pharmacie et en aromathérapie.

Selon l'AFNOR ISO 9235 :2014 (AFNOR 2014), l'hydrolat est un « distillat aqueux qui subsiste après l'entraînement à la vapeur d'eau et la séparation de l'huile essentielle lorsque c'est possible ». Les hydrolats sont les coproduits de distillation des huiles essentielles.

Nous nous concentrerons tout le long de cette thèse sur les deux principaux hydrolats les plus répandus à travers le monde :

- ✓ l'eau de fleur d'oranger (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.), dont la production annuelle mondiale en 2012 est estimée à 1500 tonnes par an.
- ✓ l'eau de rose (*Rosa damascena* Miller et *Rosa centifolia* L.), dont la production annuelle mondiale en 2012 est estimée à 1000 tonnes.

Ces chiffres sont sûrement sous-estimés car une grande part de ces hydrolats sont également produits au sein des familles et consommés localement (Fernandez, André *et al.* 2014).

2.1.1. Une production entre artisanat et modernité

2.1.1.1. Un peu d'histoire

La distillation serait née il y a 5000 ans dans la vallée de l'Indus, âge des premiers vestiges d'alambics qui ne comportaient pas de serpentins pour condenser les vapeurs, mais il n'existe aucune donnée sur l'utilisation des produits de distillation. L'utilisation d'« eaux parfumées » est mentionnée depuis l'Antiquité notamment en Egypte, en Grèce, chez les Hébreux et à Rome. Il est dit, par exemple, que Cléopâtre (69 à 30 avant JC.) faisait « tremper les voiles de son navire dans l'eau de rose, lorsqu'elle quittait Marc Antoine, afin de laisser derrière elle un sillage parfumé ». Mais l'origine de ces eaux parfumées ne peut pas être strictement attribuée à la distillation. A cette époque, des « eaux florales » étaient également obtenues par macération de fleurs dans l'eau chaude, et filtration du macérât à travers un tissu (Pellerin 2012).

Ce n'est qu'à partir du IX^{ème} siècle qu'apparaît la première description de l'obtention d'un hydrolat de rose, rédigée par le philosophe Yaqub Al Kindi (traduit en anglais par R. Hayward : « Book of perfume chemistry and distillation »), suivi par Ibn Sina au XI^{ème} siècle (Pellerin 2012).

Ces eaux florales étaient utilisées pour la toilette et la cuisine. Et plus curieusement, à la fin du XII^{ème} siècle, Saladin fit laver les murs de la mosquée d'Omar, qui avait été changée en église pendant l'occupation de Jérusalem par les Croisés, à l'eau de rose pour la purifier (Félice 1773). Ce sont les Croisés qui introduisirent l'usage des eaux florales en Europe (Pellerin 2012).

2.1.1.2. Les procédés de distillation

Il existe deux procédés de distillation pour la préparation des hydrolats de fleur d'oranger et de rose :

- ✓ **L'hydrodistillation** est un procédé dans lequel les plantes aromatiques ou les fleurs sont directement introduites sur une grille dans l'alambic, au contact de l'eau, et le tout est porté à ébullition. La vapeur d'eau chargée d'huile essentielle est ensuite entraînée vers un réfrigérant où elle est condensée. L'huile essentielle est enfin séparée de l'hydrolat par simple décantation dans un essencier (figure 1).
- ✓ **La distillation à la vapeur** (ou entraînement à la vapeur), diffère de l'hydrodistillation dans la mesure où la vapeur d'eau est produite par une unité indépendante puis entraînée vers l'alambic où sont placées les plantes aromatiques. La vapeur se charge ainsi d'huile essentielle et est entraînée vers le réfrigérant, où elle suit le même trajet que lors de l'hydrodistillation.

L'eau de fleur d'oranger est obtenue par distillation à la vapeur ou par hydrodistillation, selon le producteur, de fleurs fraîches de bigaradier (ou oranger amer : *Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.). Pour 1000 kg de fleurs et 1000 L d'eau dans la cuve de distillation (soit une proportion de 1 pour 1), on obtient deux coproduits : l'huile essentielle de fleurs d'oranger (ou néroli) avec un rendement d'environ 0,1 % et l'eau de fleur d'oranger (Albert Vieille SAS, données non publiées). A titre d'exemple, pour un industriel le prix de vente moyen d'une eau de fleur d'oranger est d'environ 10 €/L et le prix du Néroli est de 3500 €/L.

L'eau de rose de mai est obtenue par distillation à la vapeur de fleurs fraîches de rose (*Rosa centifolia* L.), dans la proportion de 300 kg de fleurs pour 450 L d'eau (soit une proportion de 1 pour 1.5). Le rendement en huile essentielle est très faible (0.01%). On obtient donc un

seul produit : l'hydrolat (Albert Vieille SAS, données non publiées). Le prix de vente de l'eau de rose de mai par l'industriel est d'environ 13 à 15 €/L.

L'eau de rose bulgare est un distillat obtenu au cours du procédé d'hydrodistillation des fleurs fraîches de rose (*Rosa damascena* Miller), généralement dans des proportions de 700 kg de fleurs pour 1000 L d'eau. Pendant la distillation, on recueille environ 1/3 de l'huile essentielle appelée « huile grège » ou « huile décantée », l'autre partie demeurée dans l'eau de distillation est recueillie par une nouvelle ébullition et se nomme rose de distillat, l'huile essentielle vendue est un mélange des 2. On obtient ainsi deux coproduits : l'huile essentielle de rose avec un rendement moyen de 0.025 %, et l'eau de rose (Albert Vieille SAS, données non publiées). A titre d'exemple, pour un industriel le prix de vente moyen d'une eau de rose bulgare est d'environ 10 à 15 €/L et le prix de l'huile essentielle est de 10000 €/L.

Le prix au litre des hydrolats est bien inférieur à celui des huiles essentielles, et même s'ils sont produits en bien plus grande quantité, ils représentent un prix de revient moins important que les huiles essentielles.

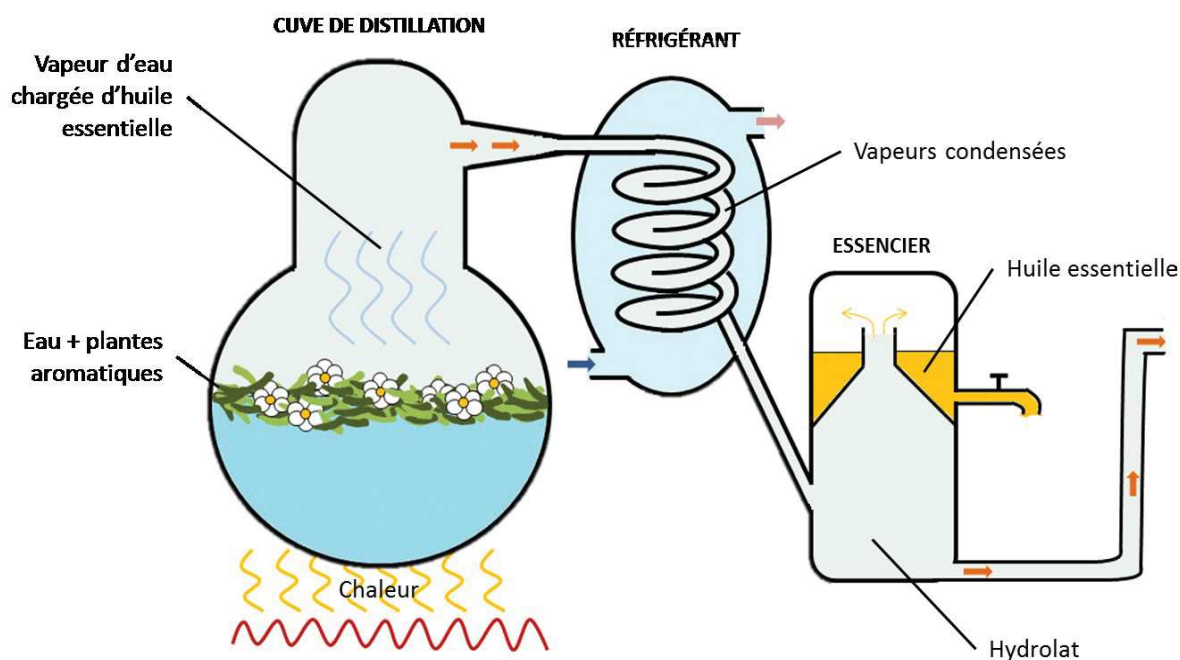


Figure 1 Schéma du procédé d'hydrodistillation

Après séparation de l'huile essentielle dans l'essencier, les hydrolats sont versés dans une cuve de transfert, et enfin versés dans une cuve de stockage, ils peuvent être préalablement filtrés sur cartouches de porosité 0,22 μm , ou bien encore pasteurisés (voir également Figure 37). Ces étapes sont généralement réalisées dans des locaux ventilés.

2.1.1.3. Impact du procédé sur le distillat

La température de chauffe et la composition du contenu de la cuve de distillation peuvent avoir une influence sur la composition du distillat. En effet, il existe un phénomène de primage et de moussage qui provoque l'entraînement de particules non-volatiles vers le distillat, telles que des particules végétales, des lipides ou des glucides provenant des fleurs. Ce phénomène résulte de la formation de bulles qui, en explosant, libèrent des microgouttelettes ayant la composition du contenu de la cuve de distillation. Ces gouttelettes sont ensuite entraînées par le flux produit par la vapeur d'eau vers le distillat. Ce phénomène est causé par une forte température de chauffe, une forte alcalinité ou une grande quantité de solides ou de composés chimiques en suspension dans la cuve de distillation (Schroeder 1990; Cosandey and von Rohr 2001; Cooper 2008; Bahadori and Vuthaluru 2010; Nakoryakov, Misyura *et al.* 2012).

La composition en composés volatils des hydrolats évolue pendant la distillation. Ils seront plus concentrés en composés volatils en début de distillation, et de plus en plus dilués avec le volume distillé. Dans le cas de l'eau de fleur d'oranger, les producteurs récupèrent généralement l'hydrolat lorsque 70% du volume d'eau dans l'alambic a été distillé, mais certains producteurs le récupèrent plus tôt, lorsque 35% du volume total a été distillé, afin d'obtenir un hydrolat plus concentré en composés volatils. Par exemple, pour un volume d'eau dans l'alambic de 1000L, on dépose 1000 kg de fleurs d'oranger, et généralement, la production est arrêtée lorsque 700 L d'hydrolat ont été produits (données producteurs non publiées).

Dans le cas de l'huile essentielle de rose (*Rosa Damascena*), produit en même temps que l'hydrolat de rose, les durées de fermentation des fleurs après la cueillette et les durées de distillation modifient sa composition. Baydar *et al.* (2008) ont analysé la composition de l'huile essentielle après différentes durées de fermentation des fleurs en sac. Une fermentation des roses pendant 6 h à 36 h avant distillation a pour effet de diminuer le rendement en huile essentielle de respectivement 0,055 % à 0,025 %. Cette fermentation a également eu pour effet d'augmenter les concentrations en citronellol et en méthyl eugénol, et d'abaisser la concentration en géraniol et en nérol. Nous pouvons penser que ce changement de composition volatile peut être dû à l'action des enzymes présentes dans la plante elle-même, mais également à l'action de microorganismes qui se seraient multipliés pendant la fermentation. Le prolongement de la durée de distillation a, quant à lui, augmenté le rendement en huile essentielle de rose et la concentration en méthyl eugénol (Baydar, Schulz *et al.* 2008). De plus, Babu *et al.* (2002) ont montré que la température de chauffe modifie sensiblement la composition de l'huile essentielle. Par exemple, lorsque

l'eau de la cuve de distillation passe de 95°C à 105°C, la composition en nonadecane et heptadecane, qui sont des composés non-volatils, est presque doublée. Ceci appuie l'hypothèse d'un entrainement de composés non-volatils lié au phénomène de primage et de moussage causé par une forte ébullition.

Les conditions de distillation sont donc déterminantes pour la composition du distillat. Elles sont mal connues et variables d'une usine de production à l'autre, et sont en partie responsables des disparités de composition des produits provenant de différents fournisseurs.

2.1.1.4. Les campagnes de production

Les campagnes de production des eaux de rose et de fleur d'oranger s'effectuent une fois par an lors de la floraison. L'eau de fleur d'oranger (*Citrus aurantium*) est produite mi-avril sur une période de une à deux semaines. Les principaux producteurs sont le Maroc et la Tunisie avec une production annuelle estimée (en 2012) pour ces deux pays de respectivement 800 tonnes et 300 tonnes d'hydrolats. L'eau de rose de mai (*Rosa centifolia*) est produite à la fin du mois de mai sur une période de deux à trois semaines, majoritairement en France. L'eau de rose bulgare (*Rosa damascena*) est produite en mai-juin, majoritairement en Bulgarie et en Turquie avec une production mondiale en 2012 estimée à 1000 tonnes (Fernandez, André *et al.* 2014).

Encadré 2 Exemple de procédés de distillation sur le terrain

Lors de cette thèse, j'ai eu l'occasion d'assister à plusieurs campagnes de production. Une campagne de production d'eau de fleur d'oranger, et trois campagnes de production (trois années consécutives) d'eau de rose de mai.

- ✓ Premier exemple : distillation de fleurs d'oranger

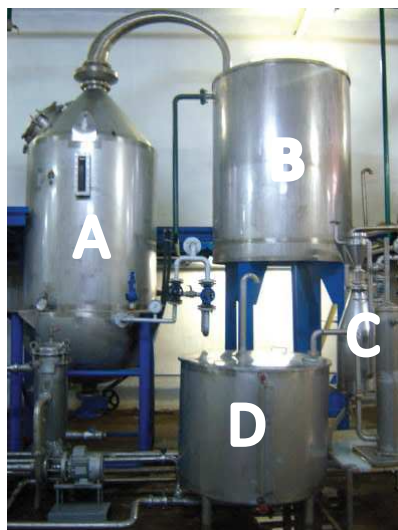
Ici, les fleurs d'oranger sont cueillies en boutons. Elles sont étalées sur le sol pendant au moins une nuit avant d'être distillées pour obtenir une faible fermentation (photographie 1).

Les boutons de fleurs d'oranger sont ensuite déposés dans un alambic en vue de l'hydrodistillation (photographies 2 et 3) (les fleurs sont mises dans l'eau de la cuve de distillation en A). L'alambic est chauffé par un double fond dans lequel est envoyée de la vapeur d'eau. La distillation s'effectue en trois à quatre heures environ. Le



Photographie 1 Boutons de fleur d'oranger étendus sur le sol 24h avant distillation. Photographie : C. Labadie - Albert Vieille SAS

distillat est envoyé vers le réfrigérant en B. L'eau de réfrigération n'est pas renouvelée pendant la distillation. L'huile essentielle et l'eau florale sont ensuite séparées dans l'essencier en C, et l'eau florale est tout d'abord stockée dans une première cuve en D.



Photographie 2 (à gauche) et 3 (à droite) : Alambic, vue d'ensemble à gauche, intérieur de la cuve de distillation à droite. A : Cuve de distillation; B : Réfrigérant ; C : essencier ; D : Première cuve de stockage avant pasteurisation. Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS

Lorsque la cuve D est suffisamment remplie, le distillat est envoyé vers le pasteurisateur en E (photographie 4 ci-après). Une fois pasteurisée l'eau florale est ensuite envoyée dans une cuve de transfert de capacité 8000 L en F. Nous ne connaissons pas les conditions de pasteurisation (température / pression). Tout le circuit est fermé. Lorsque la cuve F est pleine, l'eau florale est transférée dans des cuves noires de capacité 1000 L (photographie 5). L'eau florale n'est en contact avec l'air que lors du passage entre la cuve de transfert ci-dessous (en F), et les cubitainers noirs (photographie 5).



Photographie 4 (à gauche) : Le pasteurisateur en E et la cuve de transfert en F. Photographie 5 (à droite) : cubitainers de capacité 1000L. Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS

Les cubitainers noirs sont nettoyés avec un biocide composé de 70,4% d'éthanol.



Cette usine produit chaque année environ 300 tonnes d'eau de fleurs d'oranger. Chaque jour pendant la campagne, elle produit 24 tonnes d'eau florale.

Photographie 6 : Prélèvement d'eau de fleurs d'oranger. Photographie : C. Labadie – Albert Vieille SAS

✓ Deuxième exemple : une autre distillation de fleurs d'oranger

Cette fois-ci, les fleurs d'oranger sont cueillies à maturité. Elles ne sont donc pas forcément étalées au sol avant d'être distillées. La capacité de distillation quotidienne de cette usine de production est d'environ 30 tonnes, avec une production annuelle d'environ 300 tonnes.

Les fleurs sont déposées dans l'eau de distillation. L'alambic est chauffé par de la vapeur d'eau envoyée soit dans un double fond, soit dans un système de tubulures (photographies 7 et 8 ci-après). L'eau est ainsi portée à ébullition et les vapeurs produites sont condensées dans un réfrigérant dont l'eau est refroidie à l'air libre et réutilisée (photographie 9). L'hydrodistillation dure ensuite environ 3 heures. Le distillat est ensuite envoyé vers l'essencier. Là, il est une première fois en contact avec l'air libre. L'hydrolat est ensuite envoyé dans une cuve de transfert en métal ouverte. Puis il est stocké dans des cuves opaques de 200 L (photographie 10), avec un minimum d'air et de lumière.



Photographie 7 (à gauche): cuves de distillation. Photographie 8 (à droite): système de chauffe d'une cuve de distillation (tubulure). Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS

La distillation est arrêtée à 35% du volume total pour obtenir un hydrolat très concentré en composés volatils.



Photographie 9 (à gauche): système de refroidissement d'eau du réfrigérant. Photographie 10 (à droite): cuves de stockage 200 L. Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS

✓ Troisième exemple : une distillation de rose de mai

Les campagnes de production de l'eau de rose de mai (*Rosa centifolia*) ont été effectuées à la fin du mois de mai de chaque année. Les roses sont cueillies le matin juste avant leur distillation (photographie 11). Le producteur ne distille pas la rose de mai s'il a plu dans les 24 h précédant la récolte.

Une fois les roses cueillies, elles sont déposées sur une grille dans la cuve de distillation (photographie 12), il s'agit ici d'un entraînement à la vapeur. Le producteur dépose 300 kg de roses et ajoute 750 L d'eau. Le chauffage de la cuve de distillation s'effectue par envoi de vapeur d'eau dans les serpentins situés au fond de la cuve de distillation.



Photographie 11 (à gauche) : cueillette de la rose de mai dans un sac en toile de jute. Photographie : Albert Vieille SAS. Photographie 12 (à droite) : cuve de distillation avec la grille sur laquelle on dépose les roses fraîches en vue de la distillation. Photographie : C. Labadie – Albert Vieille SAS

Les vapeurs produites sont ensuite entraînées vers le réfrigérant (photographie 13) puis vers l'essencier et la cuve de transfert (photographie 14). Ces eaux florales sont enfin filtrées sur cartouche de porosité 0,22 μm environ un mois après le début de la production et transférées dans une cuve de stockage maintenue à 5°C ou enterrée.



Photographie 13 (à gauche) : réfrigérant. Photographie 14 (à droite) : A : essencier dans lequel sont séparés l'hydrolat et l'huile essentielle ; B : cuve de transfert munie d'un entonnoir. Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS

Par l'observation de ces différentes campagnes de production, nous avons pu constater la grande disparité d'installations techniques et de conditions de stockage selon les producteurs, qui nous montre combien la maîtrise de ce procédé est complexe. De plus, nous pouvons remarquer la présence systématique d'étapes d'exposition des hydrolats à l'air libre.

2.1.2. Différents modes de stockage et de distribution

Après leur production, les hydrolats sont entreposés dans des conteneurs >200 L en vue de leur exportation ou utilisation. Ils sont habituellement conservés dans un hangar, en plein air, dans une chambre froide, ou dans des cuves enterrées. Nous pouvons donc estimer que selon les producteurs et le type d'exportation (par bateau, par avion, par camion, etc...), les températures des hydrolats peuvent varier de 5°C dans une chambre froide, jusqu'à 40°C à 50°C s'ils sont stockés en plein air et lors du transport. Les étapes de production, de stockage ou de distribution s'effectuent dans des lieux ouverts et ventilés. Pendant la durée de vie d'un hydrolat, sa température et ses conditions de stockages sont donc très diverses et difficilement maîtrisables.

2.1.3. Composition chimique des hydrolats

Les eaux de fleur d'oranger et de rose sont composées d'environ 100 mg/L à 1000 mg/L de composés volatils (huiles essentielles) et d'une phase aqueuse. Les composés volatils confèrent aux eaux florales leurs propriétés organoleptiques. Ils sont produits par les plantes afin de se défendre contre différents microorganismes mais également d'attirer des insectes pollinisateurs. Ils sont synthétisés dans les plantes au niveau de trichomes glandulaires

(sortes de poils ou d'excroissances épidermiques), des cavités de sécrétion des feuilles, et des cellules épidermiques spécialisées des fleurs (Dunphy 2006; van Schie, Haring *et al.* 2006). Parmi ces composés volatils, l'eau de fleur d'oranger et l'eau de rose comptent une majorité de monoterpènes, de sesquiterpènes, mais également d'alcools aromatiques tels que le 2-phényléthanol.

2.1.3.1. Biosynthèse des composés volatils chez les plantes

❖ Les terpènes

Les monoterpènes et sesquiterpènes représentent plus de 70% des composés volatils des huiles essentielles. Les terpènes sont tous issus d'une unité fonctionnelle commune, l'unité pyrophosphate d'isopentényle (IPP), qui est la forme « active » de l'isoprène (cinq atomes de carbone : C₅) (figure 2). Ils sont classés selon leur degré de polymérisation d'unités isoprène.

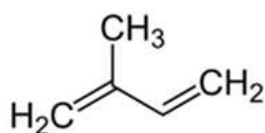


Figure 2 Structure chimique de l'isoprène, unité fonctionnelle des terpènes.

Isoprène

Les monoterpènes (C₁₀) sont constitués de deux unités isoprènes, il s'agit par exemple du linalol et du géraniol. Les sesquiterpènes (C₁₅) sont constitués de trois unités isoprènes, il s'agit par exemple du (E,E)-farnésol (Morot-Gaudry, Prat *et al.* 2012). La synthèse de l'IPP se fait par deux voies : la voie du mévalonate qui débute dans le cytosol, à partir de trois molécules d'acétyl-CoA ; et la voie du MEP (méthylerythritol-P) qui est spécifique des plastes. Puis l'IPP est transformé en pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP) par l'enzyme isopentenyl-pyrophosphate δ^3 - δ^2 -isomerase (van Schie, Haring *et al.* 2006; Morot-Gaudry, Prat *et al.* 2012; KEGG 2015). Le DMAPP est additionné à l'IPP par une élimination spécifique du proton en C2 de ce dernier, ce qui conduit à la formation du pyrophosphate de géranyle (GPP), ou de son isomère, le pyrophosphate de néryle (NPP) ; puis une autre unité d'IPP additionnée au GPP à l'aide d'une enzyme, la (2Z,6Z)-farnésyl pyrophosphate synthase, permet la synthèse du pyrophosphate de farnésyle (FPP) (figure 3). Il existe plusieurs isomères du GPP servant de précurseurs à la biosynthèse des monoterpènes (figure 4) (Lamarti, Badoc *et al.* 1994).

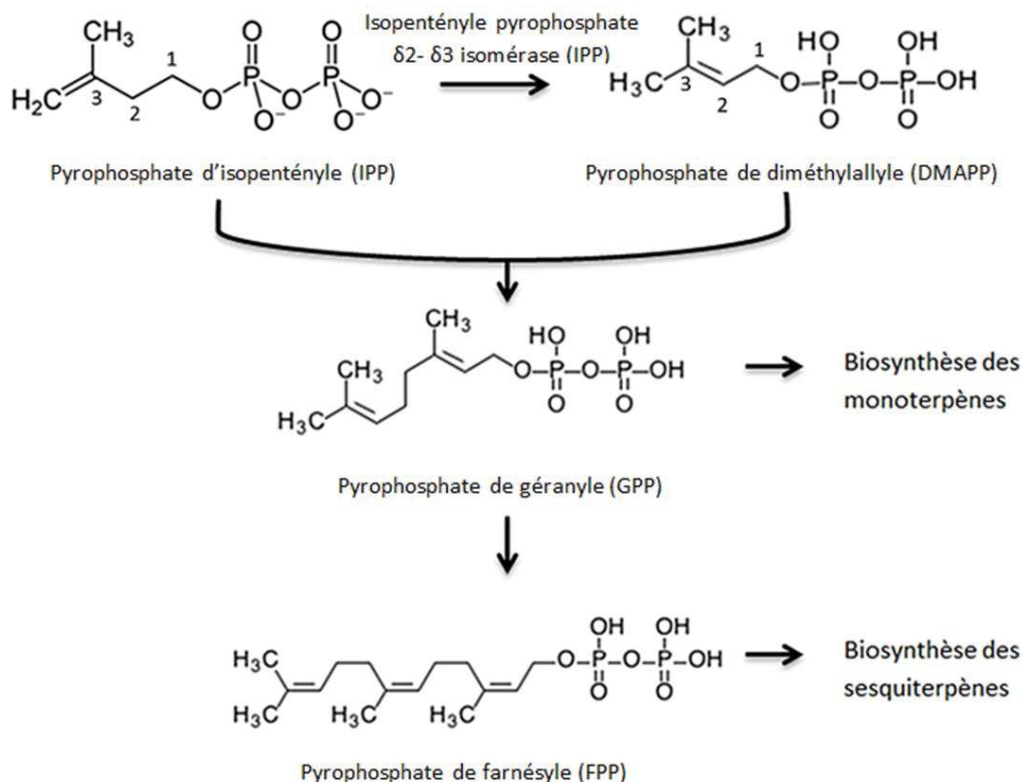


Figure 3 Voie de synthèse universelle des monoterpènes et sesquiterpènes

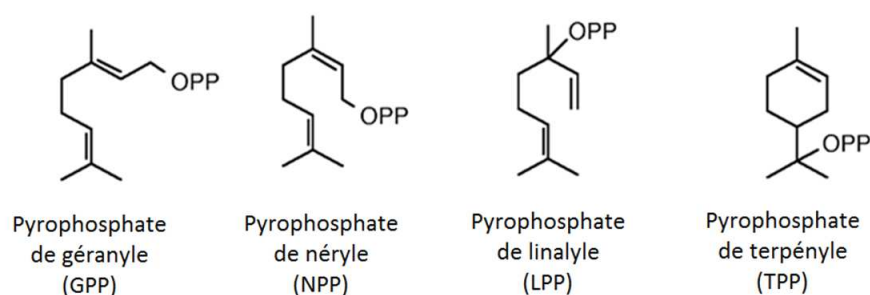


Figure 4 Précurseurs des monoterpènes, isomères du GPP (Lamarti, Badoc *et al.* 1994).

Biosynthèse des monoterpènes

Il existe deux types de monoterpènes : les monoterpènes acycliques et les monoterpènes cycliques (Lamarti, Badoc *et al.* 1994).

Les monoterpènes acycliques sont synthétisés à partir de plusieurs isomères du GPP (figure 4 et 5). Parmi les monoterpènes, on compte le nérol et le géraniol, ainsi que le linalol, le citronellol, et le myrcène. Les aldéhydes, tels que le néral et le géraniol, proviendraient respectivement d'oxydations enzymatiques du nérol et du géraniol (Lamarti, Badoc *et al.* 1994; KEGG 2015).

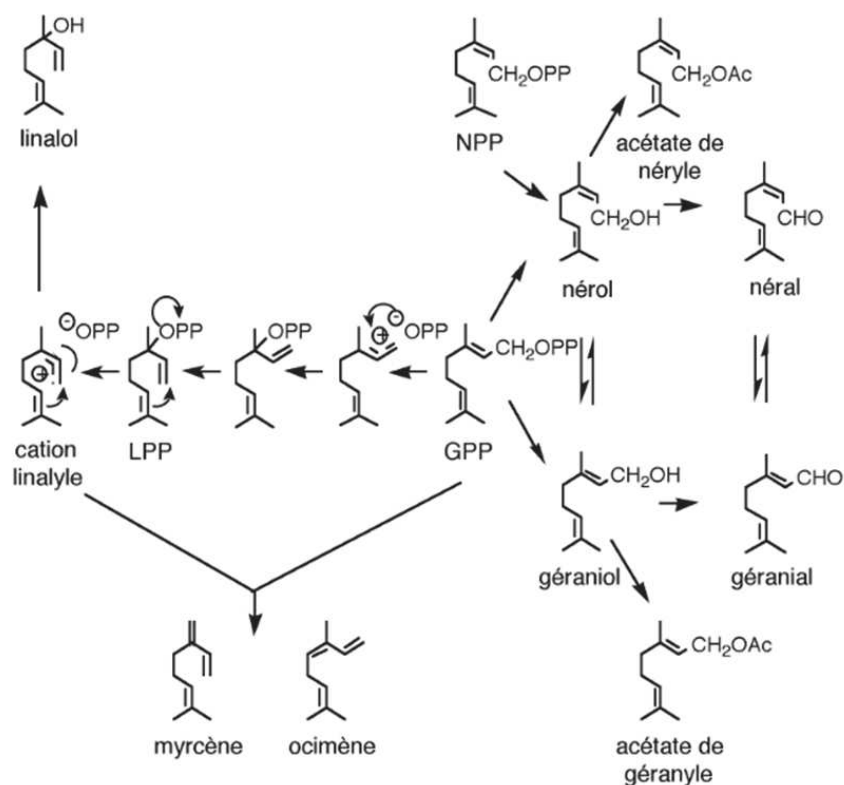


Figure 5 Voies de biosynthèse des principaux monoterpènes acycliques au niveau des trichomes sécréteurs des *Lamiacées* (Lamarti, Badoc *et al.* 1994).

Bien que le GPP soit défini comme le précurseur universel des monoterpènes, sa configuration préférentiellement *trans* ne permet pas une cyclisation directe, il semble être nécessaire de recourir à un isomère du GPP, tel que le pyrophosphate de linalyle (LPP), pour aboutir à des monoterpènes cycliques (Dewick 1995). Les monoterpènes cycliques proviennent tous d'un même précurseur, le terpényle-8, synthétisé après isomérisation du GPP en LPP, puis cyclisation de ce dernier (figure 6). Ces réactions sont rendues possibles grâce à des enzymes spécifiques, les monoterpènes cyclases (Lamarti, Badoc *et al.* 1994).

Selon Dunphy (2006), la voie de synthèse des monoterpènes dans les pétales de rose suivrait préférentiellement la voie du mévalonate au niveau du cytosol des cellules épidermiques spécialisées des fleurs. A l'inverse, selon Magnard *et al.* (2015), le pyrophosphate de géranyle (GPP), précurseur des monoterpènes, pourrait être synthétisé dans les plastides des cellules végétales par la voie du MEP, de plus, il a observé l'existence d'une enzyme, la nudix hydrolase (RhNUDX1) qui agirait en tant que géranyl pyrophosphate diphosphatase dans le cytoplasme, permettant la synthèse d'alcools monoterpéniques libres, tels que le géraniol, et qui semblent être, sous cette forme libre, responsables de l'odeur des pétales de roses.

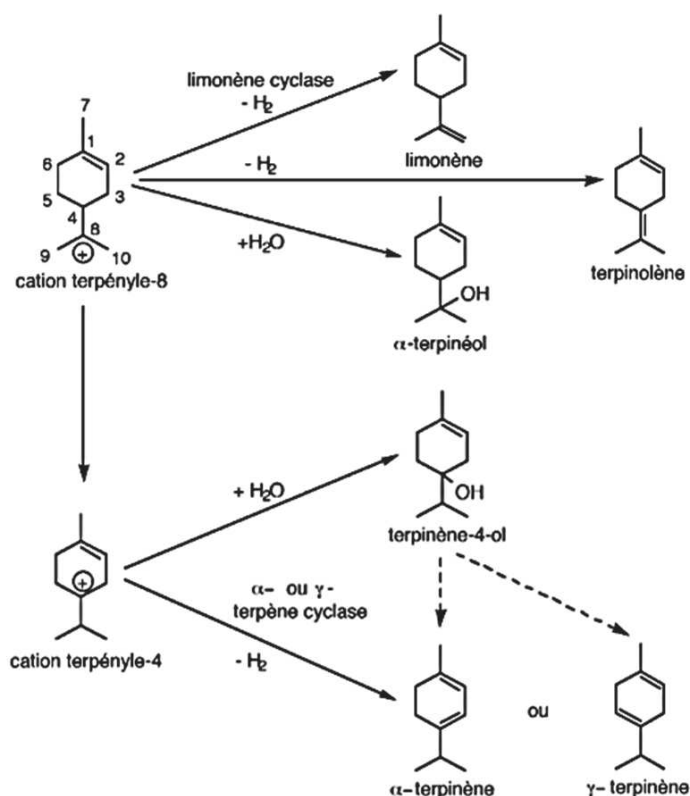


Figure 6 Biosynthèse des monoterpènes cycliques à partir du terpényle-8 (Lamarti, Badoc *et al.* 1994).

Biosynthèse des sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont synthétisés à partir du pyrophosphate de (Z,Z)-farnésyle (FPP) (figure 3). Le (Z,Z)-FPP peut également être isomérisé en pyrophosphate de (E,E)-farnésyle pour former par exemple le (E,E)-farnésol à l'aide d'une enzyme, la (2E,6E)-farnésyl-pyrophosphate diphosphohydrolase. De même, le (E)-nérolidol est produit à partir du FPP par une enzyme, la nérolidol synthase (Herbert 2012; KEGG 2015).

❖ Biosynthèse du 2-phényléthanol

Le 2-phényléthanol est le composé volatil majoritaire des eaux de rose. Il est synthétisé au niveau des plastes des pétales de rose à partir de la L-phénylalanine, via le phénylacétaldéhyde, mais également via l'acide phénylpyruvique, avec l'intervention de deux à trois enzymes : l'acide aminé aromatique décarboxylase pyridoxal-5-L-phosphate dépendante (AADC); et la phénylacétaldéhyde réductase (PAR); et potentiellement également l'enzyme acide aminé aromatique aminotransférase (AAAT) (Chen, Kobayashi *et al.* 2011; Hirata, Ohnishi *et al.* 2012) (Figure 7).

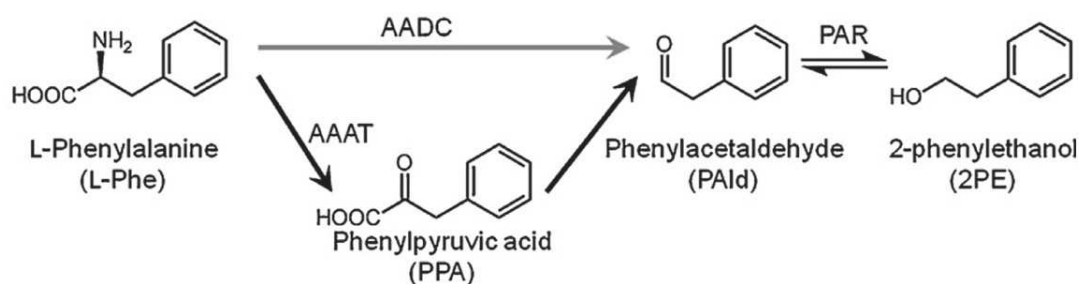


Figure 7 Voie de synthèse du 2-phényléthanol à partir de la L-phénylalanine dans les pétales de rose (Hirata, Ohnishi *et al.* 2012). AADC : l'enzyme aminoacide aromatique décarboxylase; AAAT : aminoacide aromatique aminotransférase ; PAR : phénylacétaldéhyde réductase.

2.1.3.2. La répartition des composés volatils dans le distillat

Les eaux de fleur d'oranger sont composées majoritairement de linalol et d' α -terpinéol (Jeannot, Chahboun *et al.* 2005; Dugo and Mondello 2010; Labadie, Ginies *et al.* 2015 ; Albert Vieille SAS données non publiées), et les eaux de rose sont majoritairement composées de 2-phényléthanol, de citronellol, et de géraniol (Agarwal, Gupta *et al.* 2005; Aslam Khan and Shoaib Ur 2005; Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009; Mahboubifar, Shahabipour *et al.* 2014 ; Albert Vieille SAS données non publiées). Les composés volatils présents dans les hydrolats sont les mêmes que ceux retrouvés dans les huiles essentielles coproduites mais en proportions différentes selon leur hydrophobicité (Tableaux 1 et 2). Plus un composé sera hydrophobe et plus il aura tendance à décanter vers l'huile essentielle ; au contraire, plus un composé sera hydrosoluble, et plus il sera en grande proportion dans l'hydrolat. Cette solubilité peut être calculée par mesure de la distribution d'un composé dans deux solvants (le mélange octanol/eau), notée Log P (ou Log Kow). Elle est égale au rapport des concentrations du composé d'intérêt dans les deux solvants après agitation vigoureuse. Le composé sera considéré comme hydrophile pour des valeurs de LogP inférieures à 0 et hydrophobe pour les valeurs supérieures à 0. Ainsi, plus cette valeur est élevée et plus le composé sera hydrophobe, au contraire, plus cette valeur est basse, plus le composé sera hydrophile. Nous allons également les classer et les comparer selon leur solubilité dans l'eau.

$$\text{LogP} = \text{Log}(C_{\text{octanol}}/C_{\text{eau}})$$

L'exemple ci-après représente six composés présents dans l'eau de fleur d'oranger (*Citrus aurantium*) et l'huile essentielle (le néroli) (figure 8 et tableau 1). On remarque que l'hydrolat contient les composés les plus hydrosolubles en plus grande proportion que l'huile essentielle, qui contient une plus grande proportion de composés hydrophobes.

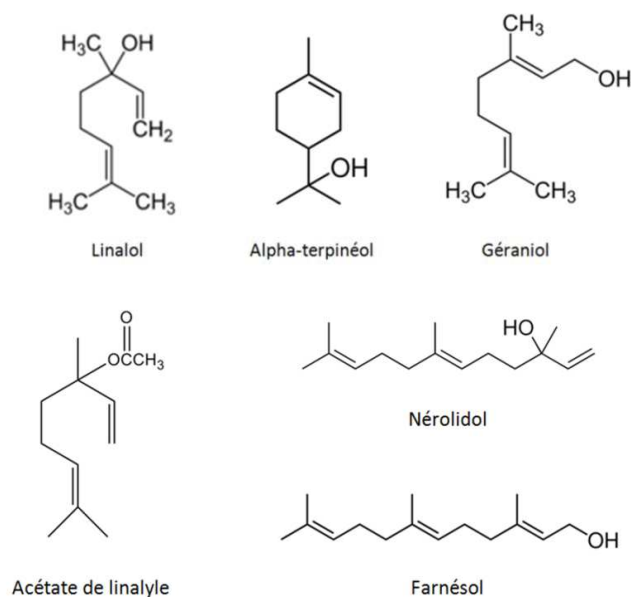


Figure 8 Composés majoritaires de l'eau de fleur d'oranger (*Citrus aurantium*) et de l'huile essentielle, le néroli.

Tableau 1 Proportion des composés volatils majoritaires dans l'eau de fleur d'oranger et l'huile essentielle, le néroli.

	solubilité dans l'eau à 25°C ^a (mg/L)	LogP ^b	eau de fleur d'oranger ^c (% aire des pics)	Neroli ^d (% aire des pics)
Linalol	1590	2,97	45,4	46,3
α-terpinéol	710	2,98	22,0	5,7
Géraniol	100	3,56	3,6	3,3
Acétate de linalyle	20	3,93	0	9,9
(E)-nérolidol	1,5	4,6	0,2	2,4
(E,E)-farnésol	1,3	5,77	0,15	2,0

^a <http://www.thegoodscentcompany.com/>

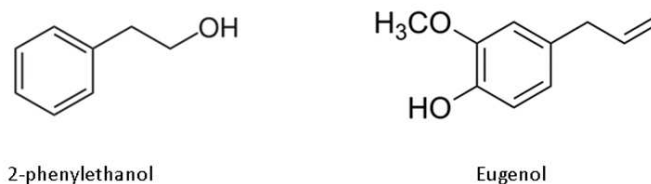
^b <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

^c (Jeannot, Chahboun *et al.* 2005) Albert Vieille SAS données non publiées

^d (Bonaccorsi, Sciarrone *et al.* 2011)

Les huiles essentielles et les hydrolats ne sont pas issues du même matériel végétal, nous ne comparons donc pas strictement leurs proportions.

Il en est de même dans l'eau de rose bulgare (*Rosa damascena*) et l'huile essentielle, où le 2-phényléthanol et l'eugénol, qui sont plus hydrosolubles, sont en plus grandes proportions dans l'hydrolat que dans l'huile essentielle (figure 9 et tableau 2).



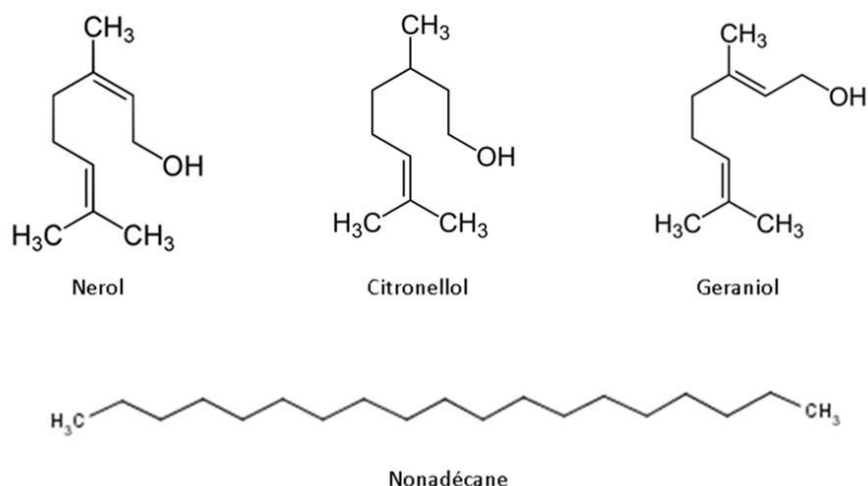


Figure 9 Principaux composés chimiques de l'eau de rose bulgare (*Rosa damascena*) et l'huile essentielle.

Tableau 2 Solubilité des composés volatils retrouvés dans l'eau de rose bulgare (*Rosa damascena*) et l'huile essentielle.

	solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L) ^a	LogP ^b	eau de rose bulgare (% aire des pics) ^c	huile essentielle de rose (% aire des pics) ^d
2-phényléthanol	22000	1,36	32,8	3,3
Eugénol	2460	2,49	3,2	1,6
Nérol	256	2,9	9,3	10,3
Citronellol	106	3,2	17,1	35,2
Géranol	100	3,56	18,7	26,7
Nonadécane	<0,001	9,9	0	14,7

^a <http://www.thegoodscentscompany.com/>

^b <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

^c (Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009)(Albert vieille données non publiées)

^d (Babu, Singh *et al.* 2002; Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009)

Ces différences de composition procurent aux hydrolats et aux huiles essentielles des odeurs caractéristiques aux nuances différentes.

2.1.4. Propriétés et réglementation

Les hydrolats sont utilisés en industrie agroalimentaire en tant que substances aromatisantes naturelles. Le Codex Alimentarius (CAC/GL 66-2008) définit les lignes directrices pour l'emploi de ces préparations aromatisantes : « celles-ci ne doivent pas entraîner de taux d'ingestion dangereux; elles doivent présenter un degré de pureté conforme à leur emploi dans les aliments; et peuvent contenir des ingrédients non aromatisants, y compris des additifs alimentaires et des produits alimentaires, nécessaires à leur production, leur entreposage, leur manutention et leur emploi ». Les hydrolats

contiennent une faible concentration en huile essentielle, et celle-ci doit être analysée et quantifiée avant leur mise sur le marché. De plus, selon la Pharmacopée, les eaux florales (ou hydrolats) doivent répondre à certains critères microbiologiques définis par la Pharmacopée (ANSM 2012) : le dénombrement sur gélose de germes aérobies totaux ne doit pas dépasser 200 UFC/mL, le dénombrement des levures et moisissures totales sur milieu gélosé ne doit pas dépasser 20 UFC/mL, et les deux pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* doivent être absents (<1 UFC/mL) dans 1 mL de produit.

Ils sont également utilisés en cosmétique, et doivent répondre aux critères de la réglementation cosmétique, selon leur composition (directive 1223/2009). A titre d'exemple, la présence de la plupart des terpènes, tels que le géraniol, le linalol, le citronellol, ou encore le limonène, doit être indiquée sur l'emballage du produit si leurs concentrations sont supérieures à 10 mg/L dans les produits sans rinçage, et supérieures à 100 mg/L dans les produits à rincer, à cause de leur propriétés allergisantes (Hagvall, Bäcktorp *et al.* 2007), mais il n'y a pas d'indication de concentration maximale d'utilisation de ceux-ci dans les produits cosmétiques. Par exemple, l'utilisation d'eau de fleur d'oranger dans les produits cosmétiques implique la mention de la présence de ces composés volatils sur l'étiquette selon leur concentration.

2.2. Des microorganismes dans les hydrolats

Les seules données précises sur les contaminations et les populations microbiennes des hydrolats sont issues de tests industriels. Les analyses microbiologiques effectuées par les entreprises recherchent la présence de germes spécifiques (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, coliformes totaux, et germes sulfito-réducteurs), et dénombrent la flore mésophile totale et les levures et moisissures totales comme spécifié dans la Pharmacopée. Mais il n'existe à notre connaissance aucune donnée bibliographique sur l'identification des microorganismes présents dans les hydrolats. On peut suspecter des études réalisées en interne dans les sociétés. A ce titre, en 1985 et 1994, la société Albert Vieille a fait effectuer des analyses microbiologiques de différentes eaux florales avec identifications des germes isolés.

En 1985, le laboratoire du centre hospitalier universitaire d'Angers a retrouvé une majorité de bactéries du genre *Pseudomonas sp.*, de plusieurs espèces différentes dans les eaux de fleur d'oranger et de rose d'origines variées (Espagne, Tunisie, et France). Il s'agit de *Pseudomonas cepacia* (maintenant appelé *Burkholderia cepacia*) ; *P. acidovorans* (maintenant appelée *Delftia acidovorans*) ; *P. testosteronie-alcaligenes* ; et *P. fluorescens* (figure 10).

<u>EAU de Fleurs d'orange cuve no 3 et ESPAGNE</u>			
		3	
DO	Cuve no 3 : PSEUDOMONAS CEPACIA	5.10	germes par ml.
		3	
	Espagne : PSEUDOMONAS CEPACIA	2.10	germes par ml.
<u>EAU de Roses</u>			
		3	
	PSEUDOMONAS CEPACIA	3.10	germes par ml.
<u>EAU de Fleurs d'orange cuve no 10</u>			
		4	
	PSEUDOMONAS FLUORESCENS	10	germes par ml.
<u>EAU de Fleurs d'orange TUNISIE</u>			
		3	
	Flore polymorphe	3.10	germes par ml. composée de :
			PSEUDOMONAS ACIDOVORANS
			PSEUDOMONAS TESTOSTERONIE-ALCALIGENES
			PSEUDOMONAS sp.
<u>CONCLUSIONS</u> Flores de densité et de nature banales			

Figure 10 Analyses microbiologiques et identification effectuées par le laboratoire du centre hospitalier universitaire d'Angers. 28 Juin 1985. Données Albert Vieille SAS.

En décembre 1994, de nouvelles analyses microbiologiques ont été menées par le laboratoire du centre hospitalier d'Angers. Les prélèvements ont été faits cette fois-ci à différents moments de la production : avant distillation ; en sortie d'essencier ; dans la cuve de transfert ; et après filtration. Les bactéries ont été cultivées sur gélose au sang et gélose CLED (milieux de culture riches contenant 36 à 42 g/L de nutriments). Les conclusions du laboratoire sont données figure 11.

<p>- Aucun Pseudomonas aeruginosa n'est retrouvé.</p> <p>- Les Eaux de forage : flore hydrique " banale ".</p> <p>- Eaux de Fleurs d'Oranger : Présence de Pseudomonas cepacia à une concentration d'environ 10 000 par ml avant distillation. La concentration en germes totaux est nettement abaissée par la distillation puisque seuls 6 germes sont retrouvés sur 100 ml. On ne retrouve pas de Pseudomonas cepacia. Par contre, la 3ème étape est marquée par une augmentation du nombre de germes (40 par ml) représentés en majorité par Pseudomonas cepacia.</p> <p>2 hypothèses :</p> <p>1) Pseudomonas cepacia n'a pas disparu totalement après distillation, mais est passé en dessous du seuil de détection de notre méthode. (rappel : filtration de 100 ml).</p> <p>2) Il y a, lors de la 3ème étape, apport de Pseudomonas cepacia. La 4ème étape, qui est une étape de filtration paraît performante, puisque le nombre de germes est proche de 0/ 100 ml.</p>
--

Figure 11 Conclusions de l'analyse microbiologique et identification des germes à plusieurs étapes du procédé de redistillation de l'eau de fleur d'oranger de Tunisie. Laboratoire du centre hospitalier d'Angers. 13 décembre 1994. Données Albert Vieille.

On remarque également la présence de *Burkholderia cepacia* dans l'eau de fleur d'oranger comme déjà remarquée en 1985 dans l'eau de fleur d'oranger et dans l'eau de rose.

La flore microbienne des eaux florales semble donc appartenir majoritairement aux genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* avec plusieurs espèces différentes. La chaîne de production ne semble pas poser de problème de contamination, et la dernière étape (microfiltration) paraît être efficace puisque les dénombrements ont montré moins de 1 UFC/100 mL en sortie de filtration (analyses de 1994) et moins de 1 UFC/mL (analyses de 1985). La contamination des eaux florales pourrait se produire dans les étapes ultérieures de traitement, et en particulier lors du stockage en cuve.

Le niveau de flore observé dans les eaux contaminées est de 3 à 4 \log_{10} UFC/mL. Ce niveau de flore, symbolisé par le point noir dans la figure 12, pourrait correspondre à quatre situations distinctes:

- ✓ Dans la situation 1, le niveau de flore observé correspond à la phase stationnaire, c'est-à-dire au niveau maximal de flore qui peut se développer. Ce niveau de flore peut être sous-estimé à cause de la présence de bactéries viables mais non-cultivables sur milieu de culture gélosé. En effet, les milieux de culture riches en nutriments, comme ceux utilisés par le laboratoire du centre hospitalier universitaire d'Angers, permettent la croissance d'une fraction des microorganismes tels que les coliformes, mais ne sont pas favorables à la culture de bactéries issues de produits aqueux pauvres en nutriments tels que les hydrolats (Allen, Edberg *et al.* 2004).
- ✓ Dans la situation 2, le niveau de flore observé correspond à la phase de croissance, il ne correspond donc pas au niveau maximal potentiel de population microbienne.
- ✓ Dans la situation 3, le niveau de flore observé correspond à la phase de décroissance bactérienne, les microorganismes ont épuisé les ressources du milieu et la population décroît.
- ✓ Dans la situation 4, une importante contamination ponctuelle, apportée par l'extérieur, a eu lieu sans forcément observer de croissance.

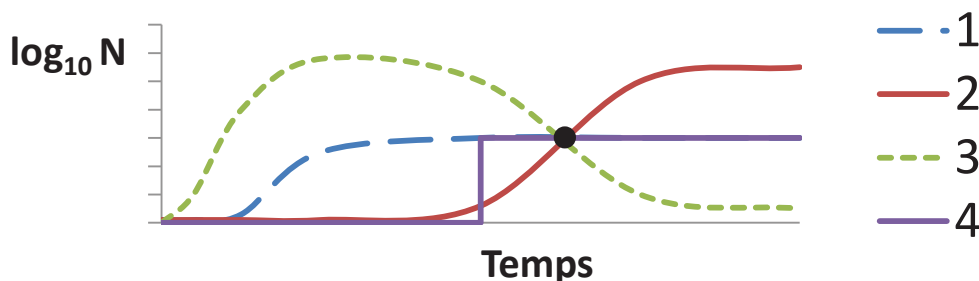


Figure 12 Différentes dynamiques théoriques de la population microbienne dans les hydrolats. Scénario 1 croissance rapide, et population maximale au niveau observé lors des analyses (●). Scénario 2 temps de latence plus long et prélèvement de l'hydrolat en milieu de phase exponentielle, la population maximale n'est pas atteinte. Scénario 3 la population bactérienne a épuisé les nutriments du milieu et est en phase de décroissance lors de l'analyse.

Ainsi, sans étude des dynamiques de croissance des microorganismes dans les hydrolats, nous ne pouvons pas conclure sur les populations maximales qui peuvent être atteintes, et sur les risques sanitaires liés à celles-ci.

2.3. Des microorganismes capables de métaboliser les composés volatils

Nous avons vu précédemment que chez les plantes, la biosynthèse des composés volatils est sous la dépendance d'un grand nombre d'enzymes. Même si ces composés volatils sont connus pour inhiber la croissance de nombreux microorganismes (Burt 2004), certains d'entre eux possèdent la faculté de les métaboliser, et de s'en servir comme substrat de croissance. La métabolisation des composés volatils pourrait entraîner une modification des propriétés organoleptiques des hydrolats qui serait susceptible de les rendre non conformes aux exigences de qualité requises pour leur commercialisation.

Nous avons également vu que les composés volatils étaient constitués d'une majorité de terpènes (monoterpènes et sesquiterpènes), nous allons donc nous concentrer sur la capacité de certains microorganismes à métaboliser ces composés.

2.3.1. Métabolisation des composés volatils

2.3.1.1. Métabolisation des monoterpènes

Par le terme « terpènes », nous regroupons les terpènes hydrocarbonés et oxygénés.

Parmi les monoterpènes des huiles essentielles, le plus répandu est le géraniol (3,7-diméthyl-(*E*)-2,6-octadien-1-ol). A titre d'exemple, l'huile essentielle de Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) en contient environ 75% ; de même, les huiles essentielles de géranium et de rose en contiennent de grandes quantités.

Le géraniol, le nérol (isomère *cis*- du géraniol) et le citronellol, peuvent être métabolisés respectivement en acide gérannique, nérique, et citronellique par *Pseudomonas citronellis* (figure 13). Cette métabolisation est amorcée par l'oxydation de l'alcool primaire vers un groupement carboxyle, suivie d'une carboxylation du carbone 10 à l'aide d'une carboxylase, et de l'hydratation de la double liaison en C2-C3 par une hydratase. Le groupement carboxyméthyle est enfin éliminé à l'aide d'une lyase avec libération d'acide acétique. Il semblerait que l'acétyl-CoA intervienne tout au long de cette voie métabolique (Cantwell, Lau *et al.* 1978). La production d'acide acétique peut avoir pour conséquence l'acidification du milieu. La voie métabolique est ensuite suivie par une succession de β -oxydations libérant

de l'acide acétique, jusqu'à dégradation complète (Cantwell, Lau *et al.* 1978; Madyastha 1984).

De même, *P. aeruginosa*, *P. citronellolis* ainsi que *P. mendocina* sont capables de métaboliser le citronellol, l'acide citronellique, et le géraniol à l'aide de l'enzyme géranyl-coenzyme A carboxylase (Cantwell, Lau *et al.* 1978; Demyttenaere 2001). Selon Hoschle *et al.* (2005), la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à métaboliser le géraniol en acide gérannique serait molybdène dépendante. *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'utiliser le citronellal comme seule source de carbone, et de convertir totalement celui-ci en acide citronellique, en citronellol, en dihydro-citronellol et en menthol (Joglekar and Dhavlikar 1969).

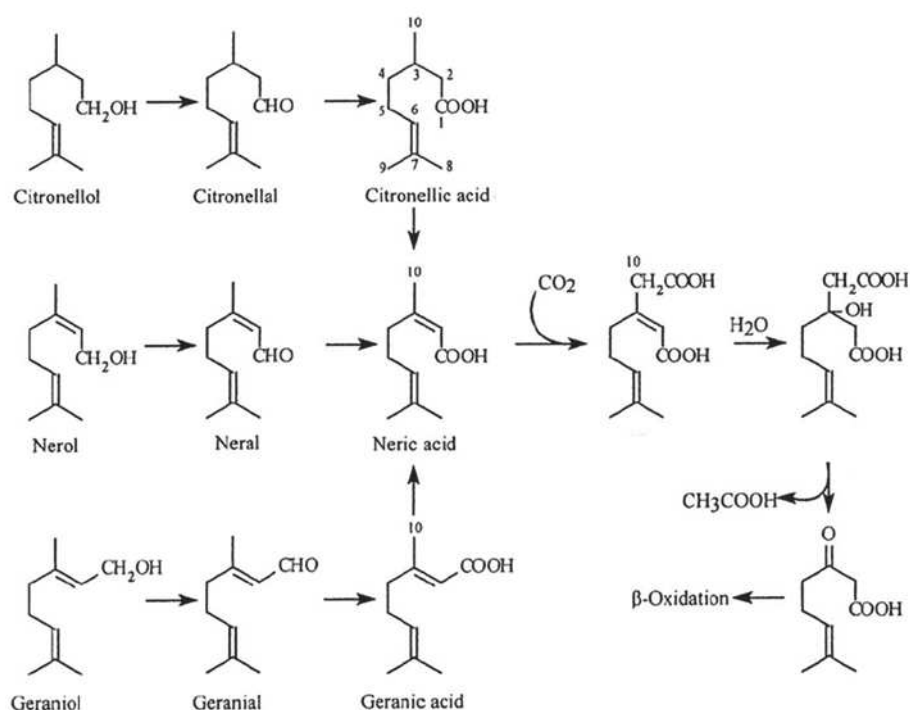


Figure 13 Métabolisation du géraniol, du nérol, et du citronellol par *Pseudomonas citronellolis* via leurs acides respectifs et dégradation complète par beta-oxydations successives (Demyttenaere 2001).

Un plasmide extrachromosomal transmissible (pSRQ60) de *Pseudomonas fluorescens*, lui permet d'utiliser le linalol comme seule source de carbone. L'utilisation du citronellol et du géraniol comme seule source de carbone est aussi possible chez *Pseudomonas putida*, grâce à la présence d'un plasmide (pSRQ50) (Vandenbergh and Wright 1983; Vandenbergh and Cole 1986). Le géraniol peut être converti en 6-méthyl-5-heptèn-2-one (Vandenbergh 1989).

De même, *Pseudomonas incognita* serait capable de métaboliser le géraniol selon deux voies métaboliques (figure 14) : une première voie dans laquelle la double liaison en C2-C3 subirait une attaque oxydative induisant la formation d'un époxyde qui s'ouvrirait en donnant un triol. Ce triol serait ensuite oxydé en kétodiol, puis en 6-méthyl-5-heptèn-2-one. Une autre

voie possible de métabolisation du géraniol par *Pseudomonas incognita* formerait l'acide gérannique par oxydation de l'alcool primaire, puis carboxylation du C10, et hydratation de la double liaison en C2-C3, puis le groupement carboxyméthyle serait éliminé tel que vu précédemment dans le cas de *Pseudomonas citronellolis* (figure 13 et 14) (Demyttenaere 2001). De plus, cette bactérie serait également capable de métaboliser le linalol par trois différentes voies métaboliques (figure 15). La première serait une oxygénation spécifique du carbone 8 qui serait ensuite oxydé pour former l'acide linalol-8-carboxylique. La présence de formes furaniques dans le milieu de culture a suggéré l'utilisation de la deuxième voie métabolique. Celle-ci entraînerait la formation d'un époxyde (le 6,7-époxylynalool) qui, après oxydation, entraînerait la formation des formes furaniques. Une troisième voie de synthèse a été envisagée : une élimination d'eau entraînant la formation d'un cation monocyclique puis d' α -terpinéol, et enfin une oxydation formant l'acide oléuropéique. Une autre possibilité entraînerait la formation d'acide oléuropéique via l'oxydation du C10 et la cyclisation du produit d'oxydation (figure 15) (Renganathan and Madyastha 1983).

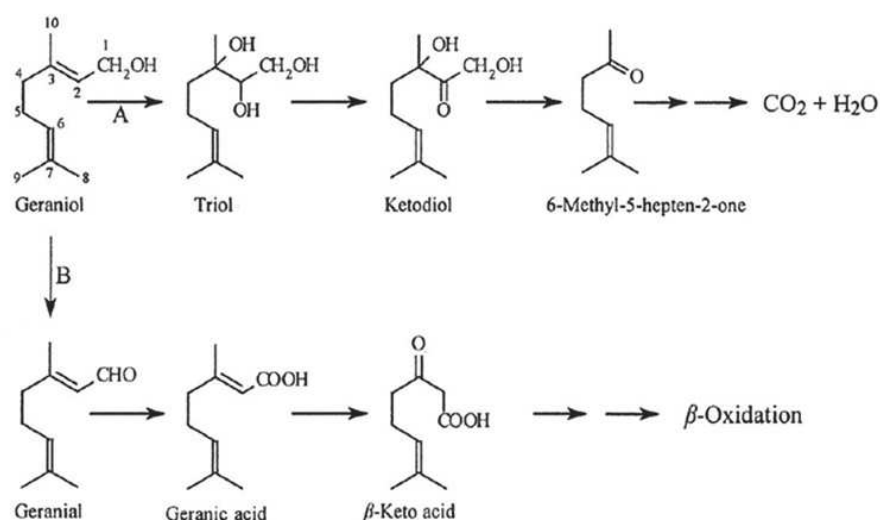


Figure 14 Les deux voies de dégradation possibles du géraniol par *Pseudomonas incognita* (Demyttenaere 2001).

Pseudomonas putida (PpG777) et *Novosphingobium aromaticivorans* (ATCC 700278D-5) seraient également capables de métaboliser le linalol grâce à la linalol-8-monooxygénase entraînant la formation de 8-hydroxylinalol puis de 8-oxolinalol (Marmulla and Harder 2014).

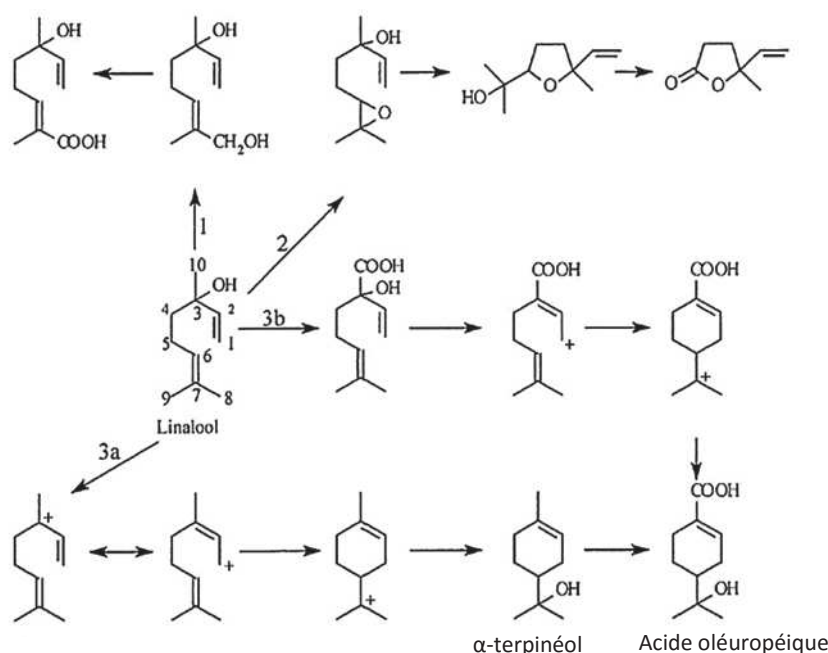


Figure 15 Voies métaboliques de dégradation du linalol par *Pseudomonas incognita* (Demyttenaere 2001)

Une bactérie du genre *Pseudomonas* est également capable de métaboliser le citronellol (et plus spécifiquement le (*R*)-(+)- β -citronellol) pour produire des oxydes de rose (*cis*- et *trans*-), par une conversion énanti-sélective (figure 16) (Pimentel, Molina *et al.* 2012).

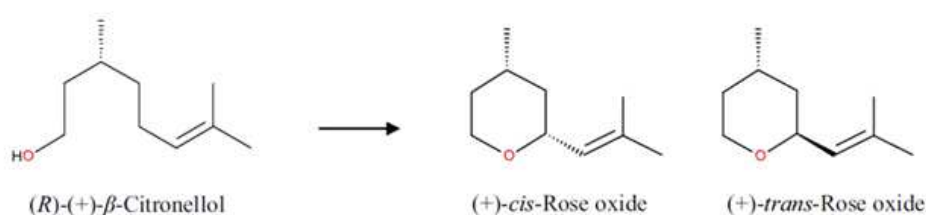


Figure 16 Métabolisation énanti-sélective du citronellol par *Pseudomonas spp.* souche *L1B2P* (Pimentel, Molina *et al.* 2012).

Castellaniella defragrans est une bactérie à Gram-négatif, capable de dégrader le géraniol et le géraniol à l'aide de deux enzymes, la géraniol déshydrogénase et la géraniol déshydrogénase (figure 17) (Lüddecke, Wülfing *et al.* 2012). En l'absence d'oxygène, cette bactérie serait également capable de dégrader le linalol en géraniol ou en myrcène à l'aide d'une enzyme, la linalol déshydrogénase-isomérase (figure 18) (Brodkorb, Gottschall *et al.* 2010).

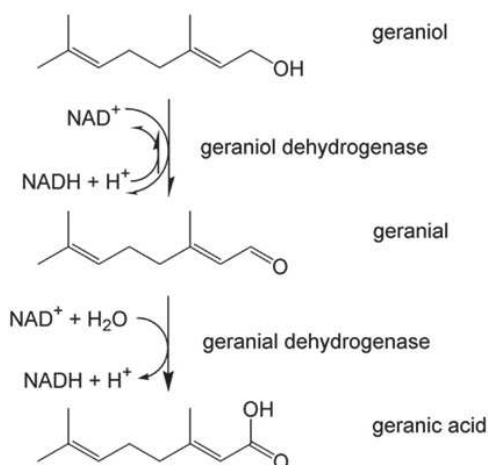


Figure 17 Voie de dégradation du géraniol par *Castellaniella defragrans* (Lüddecke, Wülfing *et al.* 2012).

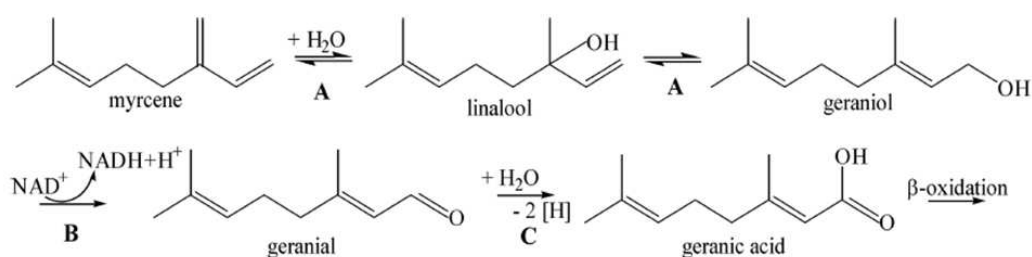


Figure 18 Voie de dégradation du linalool par *Castellaniella defragrans* (Brodkorb, Gottschall *et al.* 2010).

Des champignons sont également capables de métaboliser les monoterpènes. Parmi eux, *Botrytis cinerea* est connu pour sa capacité à métaboliser le géraniol, le nérol, et le citronellol. C'est sa capacité à métaboliser les composés aromatiques qui font de cette moisissure une moisissure d'intérêt pour l'œnologie (Shimizu, Uehara *et al.* 1982; Bock, Benda *et al.* 1988; Demyttenaere 2001). De plus, *Aspergillus brasiliensis* (anciennement appelé *Aspergillus niger*), serait capable de métaboliser le (*R*)-(-)-linalool en *trans*-oxyde de linalool (furanique et pyranoïde) (figure 19).

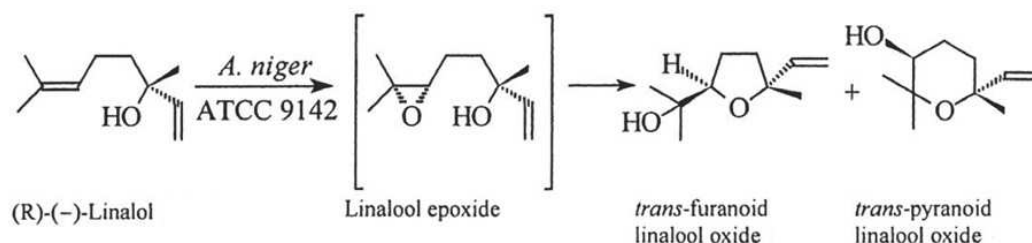


Figure 19 Voie de dégradation du linalool par *A. brasiliensis* (Demyttenaere 2001).

2.3.1.2. Métabolisation des sesquiterpènes

Le (E)-nérolidol peut être utilisé comme seule source de carbone par *Alcalygenes eutrophus* (maintenant appelée *Cupriavidus metallidurans*), bactérie à Gram-négatif appartenant aux β -proteobacteria et être métabolisé en géranyl-acétone et géranyl-acétol (Madyastha and Gururaja 1993). De même, le (E,E)-farnésol peut être dégradé de la même manière que le géraniol et le nérol (figure 13). En effet, *Pseudomonas citronnellis* serait capable d'oxyder le (E,E)-farnésol au niveau du carbone 1 pour donner l'acide farnésique suivie par une carboxylation du méthyl en position β , puis une hydratation de la double liaison en C2-C3, enfin, le groupement carboxyméthyle est éliminé à l'aide d'une lyase avec libération d'acide acétique (Demyttenaere 2001).



Figure 20 Structures chimiques du (E)-nérolidol (à gauche) et du (E,E)-farnésol (à droite).

2.3.1.3. Métabolisation du 2-phényléthanol

Le 2-phényléthanol peut être métabolisé par certains microorganismes. Ainsi, *Pseudomonas putida* serait capable de métaboliser le 2-phényléthanol en phénylacétaldehyde par une réaction réversible via l'enzyme phényléthylalcool:NAD⁺ oxidoreductase (Suhara, Takemori et al. 1969; KEGG 2015).

2.3.1.4. Métabolisation et dégradation de l'antranilate de méthyle

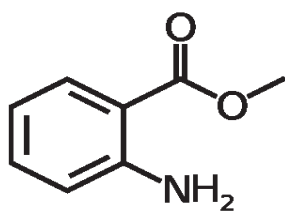


Figure 21 Formule chimique de l'antranilate de méthyle

Les bactéries ont également besoin d'une source d'azote pour se développer. Cette source d'azote pourrait provenir de composés issus de l'huile essentielle, tel que l'antranilate de méthyle. En effet, l'antranilate de méthyle peut être dégradé par des bactéries aérobies sans formation d'autre composé volatil (Aronov and Clark 1996). L'antranilate de méthyle est également photosensible. La photo-décomposition de l'antranilate de méthyle conduirait à la formation d'un radical libre NH[•]. Ce radical serait stabilisé par la formation d'un dimère après transfert d'électrons en para et en ortho et réaction avec une autre molécule d'antranilate, chaque dimère subirait ensuite une deuxième irradiation conduisant à la formation d'un trimère (Aronov and Clark 1996). En 2002, lors d'une étude de vieillissement de l'eau de fleurs d'oranger provenant de la société Albert Vieille, la société

SAI chimie a remarqué une diminution de la concentration en ce composé au cours du temps dans l'huile essentielle.

2.3.2. Impact sur les notes aromatiques

Les huiles essentielles et les hydrolats sont composés d'un mélange complexe de molécules volatiles leur conférant leurs propriétés organoleptiques. Un changement de concentration d'un des composés, même en faible concentration, aura pour effet de modifier l'odeur du produit, et donc sa qualité organoleptique. Afin de mieux appréhender l'impact de la métabolisation des composés volatils par les microorganismes, les odeurs et les notes aromatiques associées aux composés majoritaires pouvant être métabolisés ainsi que leurs produits de métabolisation (<http://www.thegoodscentscompany.com/>) sont présentées. Par exemple, la métabolisation du géraniol en 6-méthyl-5-heptèn-2-one aura pour conséquence d'apporter des notes de « moisi » et de « pommes » que le géraniol n'apporte pas. Les acides géraniques et nériques, produits à partir du géraniol et du nérol donnent des notes de « moisi », de « pieds », et de « bois ». De même, l'acide citronellique produit à partir du citronellol apporte des notes de « tabac ». Ces changements d'odeur rendent ainsi les produits non conformes aux exigences de qualité organoleptique souhaitées par les acteurs de la filière.

Tableau 3 Notes aromatiques des principaux composés des huiles essentielles pouvant être métabolisés par les microorganismes, ainsi que leurs produits de métabolisation.

Composé	Odeur	Notes
Monoterpènes et métabolites:		
Géraniol	florale	florale, verte, boisée et sucrée, agrume, myrtille, et bois de rose.
Nérol	florale	florale, verte, fraîche et sucrée, citronnée et cireuse avec une touche d'épices.
Acide géranique et nérique	verte	herbe sèche, d'acide, de moisi, de pieds, et de bois.
Citronellol	florale	florale, sucrée, d'agrume avec des nuances grasses.
Acide citronellique	verte	grasse, cireuse, florale avec de légères nuances de citronnelle, de végétaux, et de tabac.
Citronellal	florale	Sucrée, florale, rosée, cireuse, et d'agrume.
Dihydro citronellol	florale	grasse, cireuse, savon, agrume, rose et bois vert, avec des nuances d'aldéhyde.
Menthol	mentholée	menthe poivrée, frais, et boisé.
Linalol	florale	agrume, florale, boisée et sucrée, bois de rose, myrtille.

Oxydes de linalol	florale	floral, herbeux et terreux.
6-méthyl-5-heptèn-2-one	Agrume	agrume, moisi, citronnelle et pomme.
α -terpinéol	florale	pin, lilas, agrume, boisé et floral.
Sesquiterpènes et métabolites:		
(E)-nérolidol	florale	florale, verte, cireuse, boisée, et d'agrume.
Géranyl-acétone	florale	fraîche, verte, fruitée, cireuse et boisée, rose, magnolia, tropicale.
(E,E)-farnésol	florale	Douce, fraîche et sucrée, florale de tilleul et d'angélique.
2-phényléthanol et métabolites:		
2-phényléthanol	florale	florale, pétales de rose.
Phénylacétaldehyde	verte	miel, florale, rose, sucré, poudré, fermenté, chocolat avec une légère nuance de terre.

Ces exemples de métabolisation de composés volatils mettent en évidence que de nombreuses bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables de métaboliser les composés volatils. Ces changements de saveurs peuvent produire des composés malodorants ou dont l'odeur altère le produit d'origine, les rendant non-conformes aux standards de qualité souhaités.

2.4. La microflore des produits aqueux pauvres en nutriments

Comme vu dans le paragraphe 2.2, il existe peu de données sur les bactéries capables de se développer dans les hydrolats. Les hydrolats sont des milieux aqueux pauvres en nutriments (oligotrophes), aux pH compris entre 4 et 7, mais qui sont cependant susceptibles d'être contaminés par les bactéries. Ces produits présentent ainsi certaines analogies avec des eaux minérales ou aromatisées, ou encore avec des boissons non alcoolisées. Le but de ce chapitre est donc de tenter de trouver un lien entre la composition en nutriments et les microorganismes capables de se multiplier dans de tels produits.

2.4.1. Introduction

Les eaux de consommation en bouteille ne sont pas stériles. Elles contiennent une microflore autochtone provenant des sources depuis lesquelles elles sont prélevées pouvant atteindre, pendant le stockage, des populations bactériennes de 4 à 5 \log_{10} UFC/mL. Ces populations bactériennes autochtones varient selon le type d'eau, la distance de la source à la surface, la constitution géologique du sous-sol dans laquelle elle s'est constituée, sa composition en minéraux et la quantité d'oxygène dissout. La présence de microorganismes pathogènes ou allochtones dans ces eaux de consommation indique une contamination

pendant les opérations d'embouteillage (au niveau des pompes, des tuyaux, des bouchons et des bouteilles), et ces contaminations, bien que rares, peuvent provoquer des incidents sanitaires (Warburton and Austin 2000; Rosenberg 2003; Casanovas-Massana and Blanch 2012).

Selon la FDA (Food and Drug Administration, USA), une **eau en bouteille** est une « eau destinée à la consommation humaine, scellée dans une bouteille ou autre contenant, sans addition d'ingrédients exceptés ceux contenant un antimicrobien sain et adapté ». En fait, aux Etats-Unis, une eau en bouteille peut être constituée de toute eau potable provenant d'une source approuvée y compris provenant de systèmes municipaux si celle-ci a été approuvée, et peut subir tous les traitements autorisés nécessaires à sa désinfection ou sa stérilisation. En Europe, une eau en bouteille est forcément une eau de source ou une eau minérale n'ayant subi aucun traitement visant à éliminer des composés chimiques ou des microorganismes (Rosenberg 2003).

Une source d'eau approuvée peut avoir différentes origines : elle peut jaillir du sol, provenir d'un puits artésien, d'un forage, d'un système d'eau publique ou communautaire, ou de toute autre source ayant été inspectée, dont l'eau a été analysée et considérée comme saine et potable, avec ou sans traitement (Warburton and Austin 2000).

Une eau de source est une eau en bouteille puisée d'une source, d'un puits artésien ou d'un forage, originaire d'une source souterraine protégée physiquement, et qui contient moins de 500 mg/L de solides dissous. L'eau de source peut être traitée pour éliminer les composés chimiques ou microbiologiques indésirables mais, dans ce cas-là, ne pourra plus être qualifiée de « naturelle » (Warburton and Austin 2000).

Une eau minérale est une eau en bouteille obtenue depuis une source d'eau souterraine approuvée et protégée, contenant plus de 500 mg/L de matière organique dissoute. L'eau minérale peut être traitée pour éliminer les composés chimiques ou microbiologiques indésirables mais, dans ce cas-là, ne pourra plus être qualifiée de « naturelle » (Warburton and Austin 2000).

Une eau de source ou une eau minérale **naturelle** est une eau en bouteille ayant été prélevée au point d'émergence de la source approuvée et embouteillée avec des conditions d'hygiène particulières garantissant la présence de la microflore bactérienne autochtone uniquement, et ne pouvant être soumise à aucun traitement visant à éliminer des composés chimiques ou des microorganismes (Warburton and Austin 2000).

Les boissons non alcoolisées sont des boissons à base d'eau (potable, minérale ou non, de source ou de système municipal) dans lesquelles sont ajoutées une certaine proportion de jus de fruits ou de sirops. Elles peuvent subir des traitements antimicrobiens divers avant leur commercialisation (Stratford, Hofman *et al.* 2000).

2.4.2. Des analyses microbiologiques spécifiques à ces environnements

Les eaux de consommation sont des produits pauvres en nutriments nécessitant l'utilisation de techniques d'analyses particulières, adaptées aux conditions de vie des microorganismes capable de s'y développer. Les méthodes usuelles recherchent d'une part la présence de certains pathogènes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, les coliformes, et les streptocoques fécaux, les bactéries sulfite-réductrices et les bactéries sporulantes anaérobies) et d'autre part les concentrations totales en bactéries hétérotrophes. Le terme hétérotrophe regroupe toutes les bactéries utilisant des composés organiques comme source de carbone et d'énergie, c'est-à-dire la grande majorité des bactéries. Dans les analyses des milieux aqueux, le terme hétérotrophe désigne en fait les bactéries aérobies mésophiles (Douterelo, Boxall *et al.* 2014), incluant donc les bactéries pathogènes.

2.4.2.1. Les techniques de dénombrement sur milieu de culture gélosé

Il est reconnu que les analyses « cultures dépendantes » permettent la culture d'une fraction de la microflore totale. Il existe dans ces produits des populations de bactéries viables mais non cultivables. Cependant, l'utilisation de milieux de culture pauvres en nutriments, une température d'incubation d'environ 25°C et des temps d'incubation de 5 à 7 jours sont plus adaptés à la culture des bactéries des milieux aqueux (Allen, Edberg *et al.* 2004). Par exemple, le milieu de culture R2A, composé de 3,15 g/L de nutriments (peptone, casamino acides, extrait autolytique de levures, dextrose, amidon, et des sels de phosphate, sulfate et pyruvate) peut être utilisé pour l'isolement de ce type de bactéries (Rosenberg 2003; Casanovas-Massana and Blanch 2012). De même, le milieu de culture PCA (Plate Count Agar) dilué d'un facteur 4 ou 10 (soit respectivement 2,13 et 0,85 g/L de nutriments) permet également de cultiver une plus grande proportion de ces bactéries (Bischofberger, Cha *et al.* 1990; Armas and Sutherland 1999), ainsi que le milieu de culture TSA-SB (25 g/L de nutriments) mais ce dernier semble moins adapté que les deux autres milieux de culture cités précédemment (Carter, Rice *et al.* 2000).

Il y a trois grandes méthodes de dénombrement et d'isolement des bactéries des eaux de consommation sur milieu de culture gélosé. La première méthode est la filtration. Un

volume de 10 à 250 mL traverse un filtre de porosité 0,22 μm ou 0,45 μm , le filtre est ensuite déposé à la surface du milieu nutritif gélosé en boîte de Petri. La filtration est adaptée pour des milieux très pauvres en bactéries (en général $<1 \log_{10}$ UFC/mL). La deuxième méthode est la méthode d'ensemencement en masse, pour laquelle 1 mL de suspension bactérienne (au taux de dilution approprié) est déposé dans une boîte de Petri et environ 10 à 15 mL de milieu nutritif gélosé sont ajoutés. Cette méthode permet une détection de 1 UFC/mL. La troisième méthode est la technique d'étalement en surface, pour laquelle généralement 100 à 250 μL de suspension bactérienne (au taux de dilution approprié) sont déposés sur un milieu nutritif gélosé dans une boîte de Petri puis étalés, celle-ci permettant la détection de populations bactériennes ≥ 10 UFC/mL (Reasoner 2004). L'avantage du dénombrement sur milieu gélosé est de pouvoir isoler les bactéries pour les réutiliser, les identifier (par PCR puis séquençage) jusqu'à l'espèce la plupart du temps, et les caractériser phénotypiquement. De plus, c'est une méthode peu coûteuse, facile à mettre en œuvre, et robuste. L'inconvénient de la culture en milieu gélosé est la sélectivité des milieux, ne permettant pas systématiquement de cultiver la totalité des bactéries présentes dans l'échantillon. En effet, il peut y avoir des populations non négligeables de bactéries viables mais non cultivables, comme souvent remarqué dans les milieux aqueux.

2.4.2.2. Les méthodes de dénombrement et d'identification sans culture

Les techniques d'analyse microbiologique de l'eau ont évolué avec les années. Initialement tournées vers les cultures de microorganismes sur milieu gélosé, comme vu au paragraphe précédent, de nouvelles techniques dites « cultures indépendantes » permettant la détection des germes sans culture sur milieu gélosé ont vu le jour.

✓ Les techniques de microscopie :

La microscopie à épifluorescence est une technique d'imagerie utilisant des marqueurs d'ADN fluorescents, tels que l'acridine orange, le DAPI (4,6-di-amino-2-phénylindole), le CTC (chlorure de 5-cyano-2,3 ditytolyl tétrazolium), et le LIVE/DEAD® qui contient deux fluorochromes : un fluorochrome qui fluoresce en vert, le SYTO 9, capable de traverser toutes les membranes et de se fixer à l'ADN de toutes les cellules, mortes ou vivantes ; et un fluorochrome qui fluoresce en rouge, l'iodure de propidium (PI) qui ne traverse que les membranes des cellules abîmées et se fixe également à l'ADN, permettant de différencier les cellules mortes (rouges) des cellules vivantes (vertes). Ces techniques, couplée à une cellule de Malassez par exemple ou encore à une filtration sur filtre noir, permettent la détection et le dénombrement des bactéries totales dans le milieu, y compris les bactéries viables mais

non cultivables, mais également la distinction entre les bactéries viables et mortes. Cependant, elle ne permet pas d'identifier les bactéries présentes dans l'échantillon.

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), permet la détection et l'énumération de microorganismes spécifiques. Cette méthode utilise des sondes d'oligo-nucléotides (de 15 à 25 paires de bases), qui viennent se fixer spécifiquement à l'ADN ciblé dans l'échantillon. C'est une technique utile pour détecter rapidement des bactéries pathogènes, mais elle permet seulement la détection des bactéries ciblées (Douterelo, Boxall *et al.* 2014).

✓ La cytométrie en flux :

Les fluorochromes cités dans le cadre de la microscopie peuvent être utilisés en cytométrie en flux. Le fluorochrome est ajouté à l'échantillon d'eau avant l'analyse. L'échantillon est ensuite entraîné vers l'injecteur qui produit un jet composé de l'échantillon et d'un liquide de gaine qui entoure l'échantillon afin de produire un flux laminaire. Ce jet passe ensuite devant un laser et le détecteur. Les bactéries sont détectées par déviation ou transmission du signal lorsqu'elles passent au travers du laser. Cette analyse permet de détecter et de dénombrer les bactéries présentes dans le milieu de la même manière que la microscopie à épifluorescence, mais beaucoup plus rapidement, avec un traitement de données plus simple, en histogramme, en points à deux dimensions, ou en points à trois dimensions selon les paramètres mesurés. Un tri des bactéries est également possible selon la chambre d'injection utilisée (Douterelo, Boxall *et al.* 2014).

✓ Les techniques utilisant l'amplification des acides nucléiques

Ces techniques nécessitent une extraction d'acide nucléique (ADN ou ARN). La fraction d'acide nucléique d'intérêt est ensuite amplifiée (multipliée) par PCR. La technique la plus adaptée à la détection des microorganismes dans les eaux de consommation est la q-RT-PCR (PCR quantitative en temps réel). Cette technique permet de quantifier en temps réel la quantité d'ADN amplifiée pendant la phase exponentielle de la PCR à l'aide d'un fluorochrome. Cette technique ne permet pas d'identifier les microorganismes directement, mais de connaître la quantité d'ADN présent dans l'échantillon, mais ne permet pas de distinguer l'ADN provenant de cellules mortes ou vivantes (Douterelo, Boxall *et al.* 2014).

✓ Les techniques moléculaires

Toutes ces techniques moléculaires nécessitent une extraction d'ADN.

La séquence d'ADN la plus employée pour l'identification des bactéries est le gène *rrs* codant pour la sous unité ribosomale 16S. Cette région est bien conservée mais possède quelques

régions variables permettant aisément d'identifier les genres bactériens et la plupart du temps, également les espèces. D'autres régions, codant pour des protéines, permettent facilement cette identification, il s'agit par exemple des gènes *rpoB*, ou *gyrB*. Les identifications d'espèces semblent souvent rendues possibles ou améliorées par l'analyse simultanée de deux gènes (Ait Tayeb, Ageron *et al.* 2005; Tayeb, Lefevre *et al.* 2008; Mulet, Lalucat *et al.* 2010; Ferreira-Tonin, Rodrigues-Neto *et al.* 2012; Volokhov, Simonyan *et al.* 2012).

Les techniques de « Fingerprint » ou d'empreinte génétique: ces techniques permettent l'analyse des communautés microbiennes, basées sur l'étude de l'hétérogénéité des profils d'électrophorèse due aux longueurs et aux séquences nucléiques, ainsi qu'aux conformations des brins d'ADN, différents d'une espèce bactérienne à l'autre. Elles ne permettent pas une identification directe. L'identification pourra être effectuée par le séquençage des portions d'ADN amplifiées lorsque cela est possible. Parmi ces techniques, nous pouvons citer l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE, ou en gradient de température TGGE), qui est la technique de fingerprint la plus citée pour l'étude des eaux de consommation ; le polymorphisme de conformation des simples brins et le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (SSCP et T-RFLP) ; et l'analyse des régions intergéniques (RISA/ARISA/ITS) qui est plus utilisée pour l'analyse des moisissures (entre les régions d'ADN codant pour les sous-unités 18S et 28S) (Volokhov, Simonyan *et al.* 2012). Les avantages de ces méthodes sont la rapidité d'analyse et la possibilité d'une étude de la variabilité spatio-temporelle, également la possibilité d'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons, et la possibilité de séquencer les bandes d'ADN (sur les gels de DGGE/TGGE et SSCP). Les inconvénients sont le coût de telles expérimentations, les biais associés aux PCR, les espèces détectées sont seulement les espèces prédominantes (tout comme lors d'isolement et identification par techniques culturales), il n'y a pas d'identification taxonomique directe possible, les analyses des résultats sont coûteuses en temps, et les profils des gels d'électrophorèse sont parfois mal résolus (Douterelo, Boxall *et al.* 2014).

✓ Les techniques d'identification :

Le séquençage de type Sanger : c'est une méthode de séquençage par synthèse enzymatique et analyse par électrophorégramme. Le principe est le suivant : le brin d'ADN à séquencer est polymérisé à partir d'une amorce (petit oligonucléotide de séquence complémentaire au brin d'ADN à séquencer), l'élongation est effectuée par une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase, en présence des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP) et d'une petite proportion des quatre

didésoxyribonucléotides (ddNTP) (ddATP, ddCTP, ddGTP, et ddTTP) chacun associé à un marqueur de fluorescence différent. Une fois incorporés dans le nouveau brin d'ADN polymérisé, ces ddNTPs stoppent l'élongation. Il en résulte des fragments d'ADN de tailles différentes portant un marqueur de fluorescence différent sur leur base terminale. Une électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide permet ensuite de séparer ces fragments selon leur taille, et les positions des fluorochromes permettent ainsi de connaître la séquence du fragment d'ADN. Cette technique permet le séquençage d'environ 600 à 1000 paires de bases, uniquement sur des séquences d'ADN de bactéries isolées et purifiées. Elle permet le séquençage d'environ deux millions de bases en une demi-journée. Elle ne permet pas le séquençage de communautés bactériennes. L'identification bactérienne se fait ensuite par comparaison des séquences avec des banques de données en ligne telles que GenBank et EMBL (DEMEB - département de toxicologie 2011).

Les techniques de séquençage haut débit (Next-Gen sequencing): ces méthodes sont apparues à partir de 2005, et mises sur le marché à partir de 2007. Tout comme le séquençage de type Sanger, elles consistent en l'amplification (PCR) des molécules d'ADN à séquencer, l'incorporation de bases complémentaires du brin à séquencer, et la lecture de la séquence polymérisée. Mais elles permettent également le séquençage de communautés bactériennes, en plus du séquençage d'ADN provenant de bactéries isolées. Parmi les méthodes de séquençage haut débit, le pyroséquençage est l'approche la plus courante pour obtenir des informations phylogénétiques sur les communautés microbiennes. L'ADN de la communauté bactérienne, ou d'une colonie pure, est amplifié par PCR. Le mélange obtenu est déposé sur une plaque ou chaque emplacement ne contient qu'une seule molécule d'ADN. La polymérisation de l'ADN est effectuée base par base, et chaque base incorporée permet l'émission d'un signal lumineux (par chemoluminescence) qui sera lu par un détecteur CCD. Cette technique permet le séquençage d'environ un million de base par run, soit un million de bases en environ 10h. L'identification des bactéries se fait ensuite par comparaison avec des banques de données en ligne telles que GenBank et EMBL. Le séquençage haut débit a ainsi supplanté le clonage et le séquençage en éliminant les étapes de clonage et de constitution de bibliothèques de génomes (Rondon, August *et al.* 2000). Ces méthodes sont rapides, et les séquences d'ADN sont relativement courtes (environ 50 à 300 pb), il est donc nécessaire de passer par une étape de bio-informatique après le séquençage afin de réassembler les séquences coupées. Le traitement des données est fastidieux (DEMEB - département de toxicologie 2011; Douterelo, Boxall *et al.* 2014).

2.4.2.3. Les méthodes permettant un dénombrement et une identification optimale

Parmi toutes ces techniques, le dénombrement optimal de la microflore des produits aqueux semble être réalisé par microscopie de fluorescence après ajout d'un fluorochrome ou par cytométrie en flux. Ces deux techniques permettant de différencier les germes viables des germes morts, et de dénombrer également les formes viables mais non cultivables, mais ne permettent pas l'identification des bactéries observées. L'identification optimale des germes, c'est-à-dire une identification permettant une précision jusqu'à l'espèce bactérienne, est quant à elle effectuée par amplification de l'ADN (PCR) et séquençage du produit de PCR (de type Sanger ou haut débit) extrait d'une culture cellulaire pure, c'est-à-dire à partir de cellules isolées, cultivées et purifiées avant extraction de l'ADN. Cette technique permet seulement l'identification des bactéries majoritaires du milieu, les bactéries minoritaires ne seront pas identifiées.

Des méthodes intermédiaires sont également envisageables selon les informations attendues, permettant à la fois de déterminer l'abondance (q-RT-PCR), et l'identité des communautés bactériennes, telles que le séquençage haut débit, ou l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE).

2.4.3. Facteurs de survie et de croissance des microorganismes dans ces produits

Différents facteurs influencent la capacité de croissance des microorganismes, les populations maximales qui peuvent être atteintes, et le type de microorganisme qui pourra se développer dans une eau. C'est la combinaison de ces facteurs qui définit le type de microorganisme qui sera le plus apte à se développer et qui constituera donc la population majoritaire.

La température de stockage

La température de stockage influence la survie des microorganismes dans les eaux de consommation. En effet, un stockage à 4 °C semble inhiber la croissance bactérienne, un stockage compris entre 25°C et 37°C permet la croissance d'une majorité des bactéries, et un stockage à 42°C semble inactiver la microflore bactérienne (Nsanze, Babarinde *et al.* 1999).

Le pH

Le pH joue également un rôle dans la capacité de croissance des bactéries. La majorité des bactéries se développent mieux dans un milieu proche de la neutralité, mais il existe des bactéries acidophiles qui se multiplient préférentiellement dans des milieux acides, tout comme les levures et les moisissures. Les bactéries peuvent également modifier le pH du milieu dans lequel elles se développent par la production de métabolites acides, tels que l'acide acétique qui est produit par des bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Leuconostoc sp.*) (Roberts, Cordier *et al.* 2005; Branger 2012).

Les nutriments disponibles

La quantité de minéraux dans les eaux minérales, ainsi que la quantité de glucides et d'arômes dans les eaux aromatisées et les boissons non alcoolisées à base de fruits présentent un facteur important de la capacité de croissance des microorganismes. Les boissons aromatisées à base de fruits contiennent généralement des glucides (par exemple glucose et fructose), des pectines et des acides organiques (Roberts, Cordier *et al.* 2005). Les microorganismes se développent plus ou moins bien selon les ressources disponibles dans le milieu, et les populations maximales sont atteintes lors de l'épuisement du milieu en ressources disponibles.

Le temps de stockage

Au moment du prélèvement, les populations bactériennes sont relativement faibles au niveau des sources d'eaux minérales, de l'ordre de 10 UFC/mL, mais la présence de matière organique dans ces eaux, provenant du sous-sol dans lequel la source s'est formée, permet la croissance d'un maximum de 4 à 5 log₁₀ UFC/mL dans une période de 4 à 10 jours lorsque celles-ci sont mises en bouteille et stockées à température ambiante (Bischofberger, Cha *et al.* 1990; Armas and Sutherland 1999; Rosenberg 2003). La croissance bactérienne est donc rapide dès les premiers jours de stockage.

La matière du contenant

Il a été montré que les microorganismes se développent mieux dans les bouteilles plastiques que les bouteilles en verre (Bischofberger, Cha *et al.* 1990; Fewtrell, Kay *et al.* 1997). Le plastique semble plus perméable à l'oxygène et autres gaz. Il semblerait également que la surface du type de plastique utilisé favorise la formation de biofilms et sélectionne ainsi certains types de microorganismes (Jones, Adams *et al.* 1999). Il serait donc préférable d'utiliser des bouteilles en verre pour le stockage des boissons.

Le volume du contenant

Nsanze *et al.* ont montré que les lots d'eaux minérales stockées dans des bouteilles de 20 L ont plus de probabilité d'être contaminées que les eaux minérales stockées dans des bouteilles de 1,5 L, respectivement de 75 % et 10 à 40 % de lots contaminés (Nsanze, Babarinde *et al.* 1999). Bischofberger *et al.* ont montré que la concentration bactérienne maximale diminue lorsque le volume des bouteilles d'eau minérale augmente (Bischofberger, Cha *et al.* 1990). Donc les contenants de grands volumes sont plus souvent contaminés, mais en moins grande concentration. Cette observation va dans le sens de la présence d'un biofilm qui pourrait adhérer aux parois des emballages en contact avec l'eau de consommation : lorsque celle-ci est embouteillée dans un bidon de 20 L, la surface de l'emballage en contact avec l'eau est proportionnellement moins importante que dans une bouteille de 1.5 L, il y aurait donc potentiellement moins de concentration bactérienne dans un grand contenant que dans une petite bouteille.

2.4.4. Un lien entre les populations microbiennes et la composition en nutriments

Dans ce paragraphe, nous allons rassembler les données de la littérature présentant des identifications de microorganismes présents dans différentes boissons, et nous tenterons de faire un lien entre la microflore et la composition chimique.

2.4.4.1. Compositions chimiques

« Les eaux minérales proviennent d'eaux souterraines et doivent s'être constituées à l'abri de tout risque de pollution ». « Elles ne peuvent subir aucun traitement » (Chambre Syndicale des Eaux Minérales 2014). Les eaux minérales ou eaux de sources contiennent des composés organiques et minéraux, avec des teneurs en matières sèches totales de 18,1 à 2590 mg/L, voire plus. Les eaux de Vichy-Celestins ou St Yorre par exemple ont des teneurs en matière sèche de respectivement 3300 à 4800 mg/L, avec des pH compris entre 5.8 et 8 (CH4 service - Analyse de l'eau 2010). La composition chimique des eaux minérales est bien établie par des analyses régulières et ne doit pas varier dans le temps.

La composition chimique ainsi que le pH des eaux embouteillées provenant de sources municipales (Etats-Unis et Canada exclusivement) est mal connue car celles-ci subissent des traitements de purification et désinfection variés avant leur embouteillage (CNRS ; Rosenberg 2003).

Les eaux aromatisées sont composées d'eau minérale ou d'eau de source (au minimum 95 à 98 %) additionnée d'arômes ou de concentrés de fruits, et la plupart d'entre elles contiennent des sucres ou des édulcorants et de l'acide citrique. Elles peuvent avoir un pH proche de 7,0 après ajout de correcteurs d'acidité (Nevarez, Vasseur *et al.* 2009), mais leur pH est généralement compris entre 2,5 et 3,5 (Rees, Loyn *et al.* 2007). Leurs teneurs en matières sèches sont donc bien supérieures aux eaux minérales et de source et leur pH parfois beaucoup plus bas.

Les boissons non-alcoolisées (non gazeuses) contenant des concentrés de fruits ou autres sirops présentent un pH faible compris entre 2,5 et 4,5. Elles contiennent généralement des sucres (hexoses majoritairement : glucose et/ou fructose), des acides organiques (citrique et malique), des composés azotés (peptides, acides aminés etc...), des phosphates (tel que l'acide phosphorique), des sels et autres éléments sous forme de traces (sodium, magnésium, calcium etc...), ainsi que de nombreux antioxydants et conservateurs (Back, Bohak *et al.* 1999; Stratford, Hofman *et al.* 2000; Concina, Bornšek *et al.* 2010).

Les eaux en bouteilles sont plus pauvres en nutriments que les eaux aromatisées ou les boissons non-alcoolisées (non gazeuses), mais leur pH est proche de la neutralité. Les eaux aromatisées et les boissons non-alcoolisées (non gazeuses) présentent quant à elles des pH plus acides. Les hydrolats constituent un compromis entre les conditions oligotrophes des eaux en bouteilles et le pH rencontré dans les boissons aromatisées et non alcoolisées.

2.4.4.2. Population microbiennes adaptées à ces milieux et impacts

Les eaux minérales et les eaux en bouteille provenant de sources municipales présentent des microflore similaires (tableaux 4 et 5 ci-après). Leur microflore est variée, majoritairement composée de *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia cepacia*, ainsi que d'autres bactéries appartenant aux α - β - et γ -protéobacteria. La flore totale maximale peut atteindre 4 à 5 log₁₀ UFC/mL dans ces deux types d'eau en bouteille, population insuffisante pour observer un trouble ou un changement d'aspect de l'eau. Des bactéries pathogènes et fécales sont capables de survivre ou de se multiplier dans ces eaux. Ces bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, ne sont pas originaires des sources d'eau mais proviennent d'une contamination humaine pendant le procédé de prélèvement à la source, ou d'embouteillage (Rosenberg 2003).

Ces deux types d'eaux embouteillées contiennent peu de matière sèche. Les bactéries du genre *Pseudomonas sp.* et *Burkholderia sp.* sont très peu exigeantes en nutriments et semblent bien adaptées à ces types de milieux (Palleroni 2005^a; Palleroni 2005^b). Elles font

partie des genres les plus complexes des bactéries à Gram-négatif. Leurs membres sont ubiquitaires, donc largement répandus dans la nature, notamment au niveau de la rhizosphère. Beaucoup de leurs espèces sont pathogènes pour l'Homme, les animaux et/ou les plantes, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* ou encore *Pseudomonas syringae*. En effet, *Pseudomonas aeruginosa* est citée comme une des causes majeures d'infections nosocomiales chez les personnes immunodéprimées, notamment au niveau du système respiratoire et des yeux, de plus c'est un pathogène opportuniste résistant à de nombreux antibiotiques (Larrosa, Truchado *et al.* 2012). De même, certaines souches bactériennes appartenant au complexe *Burkholderia cepacia* ont été désignées comme pathogènes pour les personnes immunodéprimées, notamment souffrant de mucoviscidose (Mahenthiralingam and Vandamme 2005; Leitão, Sousa *et al.* 2010). Ils sont chemo-organotrophes, mais de nombreuses espèces peuvent également vivre sous des conditions autotrophiques, en utilisant le CO₂ et/ou le H₂ comme source d'énergie. Ils se caractérisent par leur faculté à se multiplier dans des milieux minéraux simples ou avec un seul composé organique comme source de carbone, mais qui peut être de nature très variée (par exemple on en compte plus d'une centaine pour *Burkholderia cepacia*). La plupart des espèces des genres *Pseudomonas* ou *Burkholderia* ne requièrent pas de facteur de croissance (vitamines, protéines, ou acides gras par exemple) pour se multiplier, à l'exception de *Burkholderia caryophylli* ou *Pseudomonas syringae*. Leur température optimale de croissance est autour de 28°C à 30°C. Elles peuvent donc se multiplier dans des milieux extrêmement pauvres en nutriments, tels que l'eau distillée ou l'eau minérale, à des niveaux de population relativement importants (Palleroni 2005^a; Palleroni 2005^b). Il n'est donc pas surprenant que les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* représentent les populations les plus fréquemment rencontrées dans ces milieux. Des moisissures, *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.* par exemple, peuvent être présentes dans les eaux minérales ou de source à des niveaux de population compris entre 10 et 70 UFC/100 mL. Les moisissures sont capables de se développer dans une grande variété de milieux, de pH=1,5 à pH=11, avec peu de nutriments (Lund and Eklund 2000; Kregiel 2015), il n'est donc pas étonnant de constater leur présence dans les eaux en bouteille.

Les eaux provenant de sources municipales (Canada et États-Unis), ayant subi une désinfection et une stérilisation, présentent également des bactéries des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Elles contiennent néanmoins plus de bactéries fécales, et autres pathogènes que les eaux minérales ou eaux de sources dans lesquelles la microflore autochtone n'a pas été éliminée. L'absence de microflore autochtone favorise la croissance bactérienne de ces bactéries allochtones. Ces contaminations adviennent lors du procédé d'échantillonnage ou d'embouteillage (Ramalho, Afonso *et al.* 2001; Bharath, Mosodeen *et*

al. 2003). Ainsi, l'élimination de la flore bactérienne autochtone, en permettant la croissance de bactéries fécales ou autres, apportées pendant le procédé, pourrait donc accentuer le risque sanitaire de ces eaux de consommation.

Les eaux aromatisées et les boissons non alcoolisées présentent des microflores différentes (tableaux 6 et 7), composées de bactéries acétiques, majoritairement *Gluconobacter sp.*, *Acetobacter sp.*, et de bactéries lactiques, majoritairement *Lactobacillus sp.* ou *Leuconostoc sp.*, ainsi que des levures et des moisissures, capables de survivre et de se multiplier dans des milieux acides (pH<4,5). Ces micro-organismes sont également connus pour métaboliser les boissons et provoquer des altérations visuelles telles que l'apparition d'un trouble, d'un film à la surface du liquide, d'un mycélium, d'une décoloration ou d'une perte de dioxyde de carbone et également des altérations organoleptiques telles que l'acidification du milieu, des odeurs de « fumée », de « moisi », d' « aldéhyde », ou même d' « ananas » (Roberts, Cordier et al. 2005; Kregiel 2015). Les populations bactériennes maximales sont environ 100 fois plus élevées que dans les eaux embouteillées, de l'ordre de 6 à 7 log₁₀ UFC/mL (Figure 22).

Nous pouvons donc approcher la composition chimique des microorganismes majoritaires. Une eau minérale ou une eau de source, au pH proche de la neutralité, contenant peu de nutriments, et peu ou pas de facteurs de croissance (vitamines, protéines, ou acides gras par exemple), sélectionnera une flore peu exigeante, capable de se multiplier avec une seule source de carbone et d'énergie, et en l'absence de facteurs de croissance. Les candidats idéaux pour de tels environnements sont les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Les boissons non alcoolisées (et non gazeuses) contenant une proportion de jus de fruits ou de sirops, donc tous les composés nécessaires à une bonne croissance bactérienne (facteurs de croissance, sucres, minéraux, etc...), mais possédant des pH bas (entre 2,5 et 4,5), sélectionneront une microflore préférentiellement acidophile ou acidotolérante telle que des bactéries lactiques ou acétiques, des levures et des moisissures.

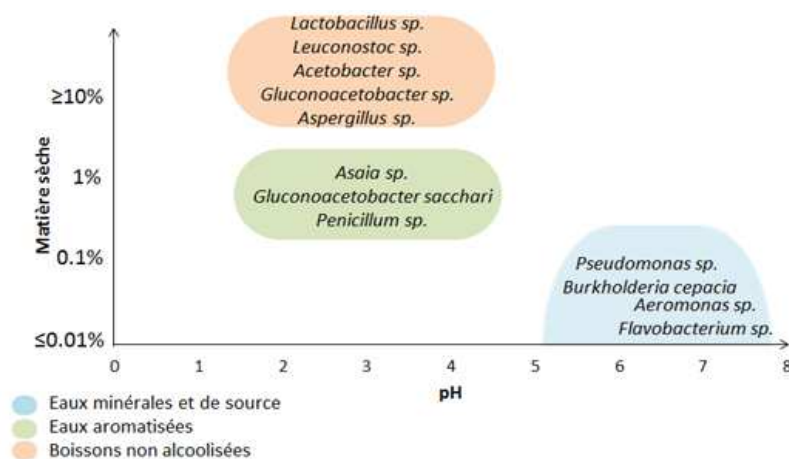


Figure 22 Populations majoritairement retrouvées dans les boissons aqueuses selon la quantité en matière sèche et le pH du milieu.

Tableau 4 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les eaux minérales

Boisson	Population maximale observée	Micro-organismes	Références bibliographiques
Eau minérale et eau de source	4 à 5 log ₁₀ UFC/mL	Bactéries: <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Burkholderia cepacia.</i> <i>Aeromonas sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Delftia sp.</i> <i>Rhizobium sp.</i> <i>Acidovorax sp.</i> <i>Sphingomonas sp.</i> <i>Janthinobacterium lividum</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Herminiimonas glaciei</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Pasteurella sp.</i> <i>Xanthomonas sp.</i> <i>Comamonas sp.</i> <i>Sphingomonas paucimaubilis</i> <i>Moxarella sp.</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Erwinia sp.</i>	(Bischofberger, Cha <i>et al.</i> 1990; Tsai and Yu 1997; Armas and Sutherland 1999; Nsanze, Babarinde <i>et al.</i> 1999; Rosenberg 2003; Varga 2011; Casanovas-Massana and Blanch 2012; Ahmed, Yusuf <i>et al.</i> 2013) (Armas and Sutherland 1999; Rosenberg 2003) (Tsai and Yu 1997; Massa, Altieri <i>et al.</i> 2001; Casanovas-Massana and Blanch 2012; Ahmed, Yusuf <i>et al.</i> 2013) (Bischofberger, Cha <i>et al.</i> 1990; Armas and Sutherland 1999; Nsanze, Babarinde <i>et al.</i> 1999; Rosenberg 2003) (Tsai and Yu 1997; Armas and Sutherland 1999; Nsanze, Babarinde <i>et al.</i> 1999; Rosenberg 2003) (Casanovas-Massana and Blanch 2012) (Tsai and Yu 1997) (Armas and Sutherland 1999) (Varga 2011; Ahmed, Yusuf <i>et al.</i> 2013) (Ahmed, Yusuf <i>et al.</i> 2013) (Tsai and Yu 1997; Armas and Sutherland 1999; Nsanze, Babarinde <i>et al.</i> 1999) (Nsanze, Babarinde <i>et al.</i> 1999)
	10 à 70 UFC/100 mL	Moisissures: <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Phoma sp.</i> <i>Alternaria alternata</i>	(Tsai and Yu 1997; Cabral and Fernández Pinto 2002) (Cabral and Fernández Pinto 2002)

Tableau 5 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les eaux en bouteilles issues de sources municipales stérilisées et désinfectées aux Etats-Unis et Canada.

Boisson	Population maximale	Micro-organismes	Références bibliographiques
Eau en bouteille de sources municipales : exclusivement Etats-Unis et Canada	4 à 5 log ₁₀ UFC/mL	Bactéries:	
		<i>Pseudomonas sp.</i>	(Edberg, Gallo <i>et al.</i> 1996; Bharath, Mosodeen <i>et al.</i> 2003)
		<i>Burkholderia cepacia</i>	(Edberg, Gallo <i>et al.</i> 1996)
		<i>Methanococcus sp.</i>	
		<i>Moxarella sp.</i>	
		<i>Acinetobacter sp.</i>	
		<i>Bacillus sp.</i>	
		<i>Escherichia coli</i>	(Bharath, Mosodeen <i>et al.</i> 2003)

Tableau 6 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les eaux aromatisées en bouteille

Boisson	Population maximale	Micro-organismes	Références bibliographiques
Eau aromatisée en bouteille	>6 log ₁₀ UFC/mL	Bactéries :	
		<i>Asaia sp.</i>	(Moore, McCalmont <i>et al.</i> 2002; Sedlackova, Cerovsky <i>et al.</i> 2011; Kregiel, Rygala <i>et al.</i> 2012)
		<i>Gluconoacetobacter sacchari</i>	(Moore, McCalmont <i>et al.</i> 2002)
		Moisissures :	
		<i>Penicillium glabum</i>	(Nevarez, Vasseur <i>et al.</i> 2009)

Tableau 7 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les boissons non-alcoolisées, non gazeuse, et contenant du jus de fruit

Boisson	Population maximale	Micro-organismes	Références bibliographiques
Boissons non alcoolisées contenant des jus de fruit	6 à 7 log ₁₀ UFC/mL	Bactéries :	
		<i>Lactobacillus sp.</i>	(Kregiel 2015)
		<i>Leuconostoc sp.</i>	
		<i>Weissella sp.</i>	
		<i>Acetobacter sp.</i>	
		<i>Gluconobacter sp.</i>	
		<i>Gluconoacetobacter sp.</i>	
		<i>Asaia sp.</i>	
		<i>Alicyclobacillus sp.</i>	(Concina, Bornšek <i>et al.</i> 2010)
		<i>Lactobacillus sp.</i>	(Back, Bohak <i>et al.</i> 1999)
		<i>Leuconostoc sp.</i>	
		<i>Weissella confusa</i>	
		<i>Coliforms</i>	(Ramadan and Abd-Elnaby 1962)
		Moisissures :	
		<i>Aspergillus sp.</i>	(Kregiel 2015)
<i>Cladosporium sp.</i>			
<i>Penicillium sp.</i>			
<i>Fusarium sp.</i>			
<i>Mucor sp.</i>			
<i>Rhizopus sp.</i>			
<i>Saccharomyces sp.</i>	(Stratford, Hofman <i>et al.</i> 2000)		

2.4.5. Incidents sanitaires

Des incidents sanitaires liés à la consommation d'eau en bouteille ont été rapportés. Par exemple, une épidémie de choléra au Portugal en 1974 a été associée à la présence de *Vibrio cholerae* au niveau de deux sources d'eau destinées à l'embouteillage et la commercialisation (Blake, Rosenberg *et al.* 1977). D'autres cas de maladies gastro-intestinales causées par la consommation d'eau en bouteille et d'eau courante ont été rapportés (Jones, Majowicz *et al.* 2007). Des chercheurs ont également isolé des amibes potentiellement pathogènes dans des eaux minérales (Salazar, Moura *et al.* 1982).

L'étude de la survie de certaines bactéries pathogènes inoculées dans des eaux de consommation (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Yersinia enterocolitica*) a montré que ces bactéries sont capables de survivre pendant une période de d'au moins deux mois (Kerr, Fitzgerald *et al.* 1999; Ramalho, Afonso *et al.* 2001). De plus, *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'atteindre des populations bactériennes de $5 \log_{10}$ UFC/mL et de survivre pendant une période d'au moins 3 ans dans des eaux en bouteille (Legnani, Leoni *et al.* 1999). De même, *Aeromonas hydrophila* est capable de se multiplier à des populations d'environ 5 à $6 \log_{10}$ UFC/mL et de rester viable pendant une période d'au moins 30 jours (Tsai and Yu 1997). Bharath *et al.* ont montré que les eaux en bouteilles provenant de sources municipales aux Etats-Unis et au Canada présentent une population non négligeable de coliformes dans de nombreux cas. Ce phénomène n'est pas observé dans les eaux minérales en bouteille n'ayant pas subi de stérilisation, donc dans laquelle la microflore autochtone est encore présente (Bharath, Mosodeen *et al.* 2003). La présence de la microflore autochtone dans les eaux minérales semble abaisser le niveau potentiel de flore allochtone (Ramalho, Afonso *et al.* 2001). Ainsi, l'eau est un vecteur potentiel de bactéries pathogènes dont les niveaux de populations doivent être surveillés afin d'éviter l'apparition de foyers de toxi-infections. La pathogénicité de ces germes dépend de leur concentration et/ou de leur virulence. De plus, la présence de la flore autochtone, non pathogène, permet de réduire le risque de multiplication importante de ces pathogènes.

2.4.6. Les réglementations et la stabilisation de ces produits

2.4.6.1. Les eaux en bouteille

Aux Etats-Unis, la réglementation impose une population bactérienne hétérotrophe totale <500 UFC/mL (Reasoner 2004); en Europe, la réglementation est plus stricte et impose des populations hétérotrophes totales <100 UFC/mL à 22°C et <20 UFC/mL à 37°C ainsi que l'absence dans 250 mL (<1 UFC/250mL) de plusieurs bactéries pathogènes telles que

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, les coliformes, et les streptocoques fécaux; et l'absence dans 50 mL (<1 UFC/50mL) de bactéries sulfite-réductrices et de bactéries sporulantes anaérobies (European Parliament & Council of European Union 2009).

Aux Etats-Unis, les eaux en bouteille peuvent provenir de sources mais également d'eaux municipales. Ces eaux sont réglementées par la FDA (Food and Drug Administration). Elles peuvent subir différents traitements visant à éliminer les microorganismes et certains composés chimiques présents tels que le chlore. Les traitements possibles sont les traitements UV ($220 \text{ nm} < \lambda < 330 \text{ nm}$) qui éliminent les bactéries et une partie des endospores et des virus ; l'oxydation à l'ozone (ozonation) est également fréquemment utilisée pour stériliser et désinfecter l'eau ; l'osmose inverse élimine les composés ayant une masse moléculaire excédant 150 à 250 daltons. L'eau municipale peut subir en plus une déchloration ou autre désinfection avant d'être soumise aux différents traitements cités précédemment (Rosenberg 2003; Reasoner 2004). L'eau municipale peut également être traitée avec du charbon actif, et être enrichie en minéraux avant sa commercialisation (Bharath, Mosodeen *et al.* 2003), elle peut également être clarifiée, c'est-à-dire laissée à décanter pour permettre aux particules lourdes de se déposer au fond d'un bassin, avant la désinfection ou la filtration (CNRS).

Cette étape de désinfection de l'eau peut entraîner la formation de coproduits indésirables lorsque les désinfectants eux-mêmes (tels que le chlore, le dioxyde de chlore, ou les chloramines) réagissent avec la matière organique, le brome, ou encore l'iode présents dans l'eau. Ces coproduits se forment à des concentrations allant du ng/L au µg/L. A l'heure actuelle on dénombre environ 85 coproduits de désinfection, dont plusieurs sont déjà réglementés par la FDA (Food and Drug Administration), l'OMS (Organisation mondiale de la santé), et l'UE (Union Européenne), tels que les trihalogénométhanés (THM) dont fait partie le chloroforme. Parmi eux, huit composés sont toxiques, et cancérigènes, et seulement quatre d'entre eux, dont le bromodichloromethane, l'acide dichloracétique, l'acide dibromoacétique, et le formaldéhyde, sont réglementés; 29 d'entre eux sont considérés comme génotoxiques (tels que l'hydrate de chloral qui est hallucinogène, ou le chloroacétaldéhyde); et il n'existe pas de données toxiques pour les autres coproduits. De plus, l'utilisation de l'ozone ou des chloramines pour la désinfection de l'eau produisent plus de coproduits de désinfection que le simple ajout de chlore (Richardson, Plewa *et al.* 2007). Les risques potentiels liés à une importante consommation d'eau désinfectée sont en cours d'évaluation (Michaud, Kogevinas *et al.* 2007; Richardson, Plewa *et al.* 2007).

2.4.6.2. Les boissons non alcoolisées

Les boissons non alcoolisées, non gazeuses, contenant ou non du jus de fruit contiennent des conservateurs naturels tels que des huiles essentielles, ou des composés phénoliques, mais également des acides organiques. Le pH est également un facteur important de la stabilité des boissons non alcoolisées. La plupart de ces boissons présentent un pH inférieur à 4,0 permettant d'inhiber naturellement la croissance de la majorité des bactéries. Mais lorsque tous ces inhibiteurs naturels ne suffisent pas à stabiliser les boissons, il faut recourir à d'autres méthodes. La pasteurisation éclair est souvent pratiquée dans de nombreux jus de fruit mais la chaleur est susceptible d'altérer les propriétés organoleptiques. En l'absence d'autre moyen de stabilisation, l'utilisation de conservateurs chimiques est autorisée. Ces conservateurs doivent être adaptés à la boisson dans laquelle ils sont ajoutés car plusieurs paramètres, tels que le pH, et la présence d'autres composés, tels que des acides organiques, peuvent agir en synergie, ou au contraire, diminuer l'effet antimicrobien de ces conservateurs (Roberts, Cordier *et al.* 2005). L'utilisation de conservateurs chimiques dans les boissons est très réglementée et cette réglementation varie selon le pays de distribution du produit. Généralement, l'addition d'acides organiques tels que le sorbate de potassium ou le benzoate de sodium (seuls ou mélangés) sont autorisés, mais à différentes concentrations qui varient drastiquement entre les pays, par exemple de 30 mg/L en Autriche à 1000 mg/L en Allemagne ou en Suède. L'addition de parabènes, de sulfites ou d'acide formique, est également autorisée dans certains pays, n'incluant pas la France (Stratford, Hofman *et al.* 2000; Roberts, Cordier *et al.* 2005).

Pour conclure, les produits pauvres en nutriments ayant des pH proches de la neutralité (eaux minérales ou de source, et eaux municipales) semblent permettre la croissance d'une microflore peu exigeante et ubiquitaire, telle que les bactéries des genres *Pseudomonas sp.* et *Burkholderia sp.* jusqu'à des concentrations comprises entre 4 et 5 log₁₀ UFC/mL sans altération de l'aspect visuel (turbidité, changement de couleur) des eaux en bouteille, ainsi que des moisissures en faible proportion. La présence de sucres et autres nutriments, tels que des extraits de jus de fruits, ainsi que de nombreux acides organiques abaissant le pH à des valeurs inférieures à 4,5 dans les boissons, permet la croissance de bactéries acidophiles et de moisissures jusqu'à des concentrations voisines de 7 log₁₀ UFC/mL capables de causer des altérations visuelles et organoleptiques. De plus, la microflore des boissons peut être à l'origine de toxi-infections alimentaires. Il existe de nombreux traitements physiques permettant d'éliminer la microflore des eaux en bouteille, mais ces traitements physiques ne permettent pas d'empêcher une microflore allochtone de contaminer de nouveau ces eaux. Dans le cas des boissons, les traitements chimiques sont autorisés mais très réglementés.

Seuls quelques composés chimiques, tels que les acides faibles, les sulfites, ou les parabènes peuvent être autorisés et utilisés dans un nombre réduit de pays.

Les hydrolats sont des eaux pauvres en nutriments, contenant des composés volatils, ils pourraient être assimilés à des eaux minérales, ou eaux aromatisées dans lesquelles il n'y aurait eu aucun ajout de sucre ou d'acide organique. Nous pouvons donc légitimement attendre une flore de type *Pseudomonas* sp. et *Burkholderia* sp., ainsi que la présence de moisissures.

2.5. Une stabilisation des hydrolats qui doit préserver leur finesse

Certains lots d'hydrolats ont été classés non conformes à cause d'une prolifération microbienne au-delà de la limite de $2 \log_{10}$ UFC/mL imposée par la Pharmacopée, d'un changement de turbidité, de couleur, ou d'odeur. Les microorganismes responsables de cette non-conformité peuvent être inhibés ou éliminés par l'utilisation de conservateurs. Les antimicrobiens industriels habituellement utilisés dans l'industrie cosmétique et/ou agroalimentaire agissent sur la membrane plasmique des cellules, c'est ainsi le cas des acides organiques, des parabènes, des phénols et des alcools, mais également sur les fonctions cellulaires, comme par exemple les isothiazolinones ou le bronopol. L'objectif de ce chapitre est, dans un premier temps, de faire un point sur ces conservateurs, leur mode d'action, ainsi que leurs avantages et inconvénients, et dans un deuxième temps, d'identifier des composés potentiels permettant de stabiliser les eaux florales. Ces composés doivent être hydrosolubles, inertes vis-à-vis des hydrolats, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas en modifier l'odeur, la couleur ou la texture, et doivent également être conformes aux réglementations cosmétiques et/ou agroalimentaires.

2.5.1. Les conservateurs actuellement utilisés pour la stabilisation des hydrolats

Même si de nombreux hydrolats sont commercialisés sans ajout de stabilisant, un bon nombre d'entre eux peuvent être stabilisés par l'utilisation de conservateurs commerciaux, le plus souvent utilisés en mélange, selon leur application agroalimentaire, cosmétique, ou en aromathérapie. Il s'agit par exemple de mélanges de thiazolinones (5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one) (par exemple MicroCare® IT/ITO, Thor personal care, Compiègne, France) ; de mélanges de chlorphénésine et de parabènes (par exemple Elestab FL 15, Laboratoires Sérobiologiques, Pulnoy, France) ; de mélanges de phénoxyéthanol, chlorphénésine et parabènes (par exemple l'Elestab 388, Laboratoires

Sérobiologiques, Pulnoy, France); de mélanges de 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol), d'hexamidine diisethionate et de parabènes (par exemple l'Elestab 4112, Laboratoires Sérobiologiques, Pulnoy, France); ou encore d'un mélange sans parabène contenant du 2-phénoxyéthanol et de l'acide sorbique (par exemple l'Elestabl PB free LS 9842, Laboratoires Sérobiologiques, Pulnoy, France). Le 2-phénoxyéthanol peut également être utilisé pur, avec une dose maximale de 3 à 10 g/L dans le produit fini. Tous ces mélanges sont jugés efficaces dans les hydrolats mais leur utilisation est limitée aux produits cosmétiques, dans des doses relativement faibles. De plus, les challenge-tests effectués avec ces conservateurs utilisent des souches bactériennes pathogènes et d'altération ciblées pour l'industrie cosmétique, mais il n'existe aucune donnée sur l'efficacité de ces produits dans les hydrolats ni dans le temps.

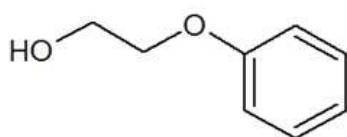
Des acides organiques sont également utilisés, la plupart du temps en mélange, dans des concentrations ne permettant pas leur utilisation agroalimentaire. Il s'agit de l'acide citrique, du benzoate de sodium, et du sorbate de potassium, utilisés respectivement à des doses de 1 à 2 g/L chacun (sans mention du pH d'utilisation). De même, à notre connaissance, l'efficacité de ces acides organiques n'a pas été démontrée dans les hydrolats.

2.5.2. Les conservateurs autorisés dans les produits cosmétiques

Les conservateurs décrits dans ce chapitre correspondent aux conservateurs autorisés par le règlement (CE) du Parlement européen et du Conseil n° 1223/2009, du 30 novembre 2009, relatif aux produits cosmétiques. Ce règlement définit les bonnes pratiques pour la production de produits cosmétiques.

2.5.2.1. Le 2-phénoxyéthanol

Le 2-phénoxyéthanol (Figure 23) est utilisé en cosmétique (maquillage, shampoings, savons, crèmes etc...), dans certains vaccins comme agent de conservation, dans des détergents et comme solvant pour d'autres agents de conservation de type parabènes, isothiazolinone, etc... Son utilisation dans les produits cosmétiques est limitée à 10g/L dans les préparations prêtes à l'emploi (directive cosmétique 1223/2009).



N° CAS : 122-99-6

Synonymes : EGPhE ; Ether monophényle de l'éthylène glycol ; 1-hydroxy-2-phénoxyéthane.

Figure 23 Structure chimique du 2-phénoxyéthanol.

❖ Mode d'action

Le mécanisme d'action du 2-phénoxyéthanol serait dû à la perturbation de la phosphorylation oxydative, participant à la synthèse d'ATP dans la chaîne respiratoire bactérienne, et à l'inhibition de la malate déshydrogénase, intervenant dans le cycle de Krebs, par compétition sur le site actif de l'enzyme. Le 2-phénoxyéthanol augmenterait également la perméabilité de la membrane plasmique aux ions potassium et inhiberait la synthèse d'ADN et d'ARN (Poudrier 1990).

❖ Propriétés

Il est hydrosoluble, et incolore. Il est très efficace contre une grande variété de bactéries, moisissures et levures, et limite ainsi le risque de contamination microbienne. Sa concentration minimale inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* serait de 10 g/L, 4 g/L contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus brasiliensis*, et 6 g/L contre *Candida albicans*. Il agit également en synergie avec les isothiazolinones (Lundov, Krongaard *et al.* 2011; Rushton, Sass *et al.* 2013).

Il est cependant facilement absorbé par voie orale et cutanée (Roper, Howes *et al.* 1997). Il est irritant pour la peau (Lee, An *et al.* 2007), c'est un allergène reconnu qui peut également provoquer des troubles neurologiques (Scognamiglio, Jones *et al.* 2012). Il induit une apoptose cellulaire *in vitro* presque totale à 10 g/L de concentration (Anselmi, Ettorre *et al.* 2002). C'est également un anesthésique de certaines espèces de poissons lorsque ceux-ci sont exposés à une concentration de 0,167 mL/L (Tsantilas, Galatos *et al.* 2006). C'est donc un produit à utiliser avec précaution et ne pas répandre dans l'environnement.

Le 2-phénoxyéthanol peut également avoir des effets sur la texture des crèmes cosmétiques. Au-delà de 4 g/L, le 2-phénoxyéthanol fluidifie la texture des crèmes, qui deviennent instables et totalement liquides au-delà de 8 g/L (Lundov, Krongaard *et al.* 2011).

2.5.2.2. La chlorphénésine

La chlorphénésine (3-(p-Chlorophénoxy)-propane-1,2-diol) (Figure 24) est un additif autorisé en cosmétique dans la limite de 3 g/L dans les préparations prêtes à l'emploi (directive 1223/2009). Son numéro CAS (*Chemical Abstracts Service*) est 104-29-0, à ne pas confondre avec le carbamate de chlorphénésine, également appelé « chlorphénésine », mais qui n'est pas utilisé en cosmétique (CAS 886-74-8).

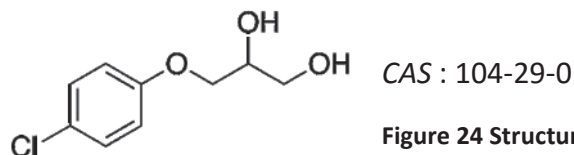


Figure 24 Structure chimique de la chlorphénésine.

La chlorphénésine (commercialisée sous le nom d'Elestab® CPN) présenterait une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,5 à 3 g/L contre de nombreuses bactéries pathogènes à Gram-négatif et Gram-positif, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, ou encore *Staphylococcus aureus* et de 1,5 g/L contre les moisissures (*Aspergillus brasiliensis* (*niger*) et *Penicillium pinophilum*) (Données fournisseur Elestab® CPN : Laboratoires Sérobiologiques).

La chlorphénésine peut causer des irritations de la peau, qui seraient accentuées lors du mélange avec du 2-phénoxyéthanol ou des parabènes (Lee, An *et al.* 2007). Elle est facilement absorbée par la peau, et présente une toxicité aigüe chez le rat avec des symptômes tels que difficultés respiratoires (dyspnée), hypotonie, apparition de piloérection (chair de poule), et perte de réflexes. La DL₅₀ (Dose létale 50, qui entraîne la mort de 50% des individus dans un test de toxicité) est de 3 g/kg chez le rat. D'après Bergfeld *et al.*, la dose autorisée par application sur l'épiderme humain ne présenterait pas un danger pour la santé humaine (Bergfeld, Belsito *et al.* 2012).

2.5.2.3. Le bronopol

Le bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) (figure 25) est un agent de conservation des produits aqueux. C'est un bactéricide efficace jusqu'à pH=8 notamment contre les bactéries du genre *Pseudomonas*. Il est autorisé dans les produits cosmétiques à une concentration maximale de 1 g/L pour éviter la formation de nitrosamines (N-nitroso diéthanolamine).

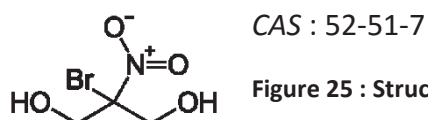


Figure 25 : Structure chimique du bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol).

❖ Mode d'action

L'action antimicrobienne serait due à l'oxydation des thiols, présents par exemple sur les protéines membranaires contenant de la cystéine, en présence de bronopol. De plus, les coproduits de cette oxydation (des peroxydes par exemple) augmenteraient son action antimicrobienne (Shepherd, Waigh *et al.* 1988).

❖ Propriétés

Dans un milieu de culture défini, le bronopol présente une concentration minimale inhibitrice très basse, de 13 mg/L contre *Escherichia coli*, et une concentration minimale bactéricide de 100 à 500 mg/L (Shepherd, Waigh *et al.* 1988).

Le bronopol est plus stable à pH acide qu'à pH basique (Dunnett and Telling 1984). Sa dégradation peut produire une faible quantité de formaldéhyde (Figure 26) (Dunnett and Telling 1984; Kireche, Peiffer *et al.* 2011). Sa dégradation produit également différentes molécules telles que le 2-bromoéthanol et le bromonitrométhane, qui sont potentiellement allergènes (Kireche, Peiffer *et al.* 2011). Il serait stabilisé par la présence d'antioxydants tels que le BHT, l'ascorbate, ou l' α -tocophérol lorsque sa concentration ne dépasse pas 1 g/L. Au-delà de cette concentration, seul l' α -tocophérol évite la formation de nitrosamines, mais l'utilisation d' α -tocophérol entraînerait la formation de nitrites dans les produits cosmétiques (Dunnett and Telling 1984). Chez l'homme, les nitrites pourraient faire précipiter l'hémoglobine (Harvey, Cave *et al.* 2010).

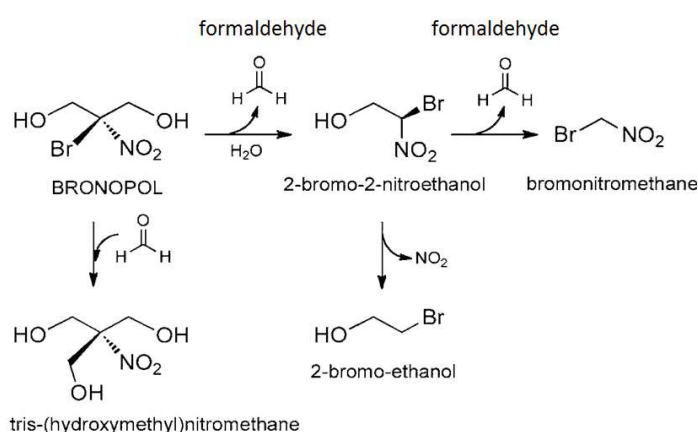


Figure 26: Voie de dégradation du bronopol *in vitro*. Structures chimiques de ses métabolites (Kireche, Peiffer *et al.* 2011).

2.5.2.4. L'isothiazolinone

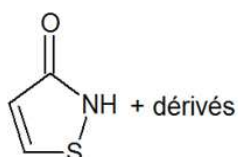


Figure 27 Structure chimique de l'isothiazolinone CAS 1003-07-2

L'isothiazolinone (Figure 27) (1,2-thiazol-3-one) est un conservateur utilisé depuis les années 1980 dans les produits cosmétiques et ménagers, ainsi que dans divers produits industriels. On trouve en général un mélange de méthyl-chloro-isothiazolinone (MCI) et de méthyl-isothiazolinone (MI) dans les proportions 1:3. Depuis 2005, la MI est également utilisée seule dans les produits cosmétiques. Elle peut être utilisée avec le 2-phénoxyéthanol, dont l'effet de

synergie permet de réduire la quantité de conservateurs utilisée (Lundov, Krongaard *et al.* 2011). Le mélange MCI/MI, dans une proportion 3:1, est autorisé, par la directive 1223_2009 relative aux produits cosmétiques, pour une concentration maximale de 0,015 g/L dans les produits cosmétiques prêts à l'emploi.

❖ Mode d'action

Le mécanisme d'action des thiazolinones semble être un processus en deux étapes, impliquant tout d'abord une inhibition de la croissance bactérienne, suivie d'une perte de viabilité. L'inhibition de la croissance serait due à la perturbation du métabolisme cellulaire, notamment par l'interaction des thiazolinones avec des enzymes spécifiques telles que les déshydrogénases (pyruvate, succinate, et lactate déshydrogénases), impliquées dans le cycle de Krebs, et la NADH déshydrogénase. La mort cellulaire serait causée par la perte des thiols des protéines tel que décrit par Terry M. William (Williams 2007).

❖ Propriétés

La concentration minimale inhibitrice (CMI) du mélange MCI/MI contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* serait de 2 mg/L, 500 µg/L contre *Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans*. De même, la CMI méthyl-isothiazolinone seule serait de 45 mg/L contre *Staphylococcus aureus*, de 15 mg/L contre *Pseudomonas aeruginosa*, et de 65 mg/L contre *Candida albicans*, mais >100 mg/L contre *Aspergillus niger* (Lundov, Krongaard *et al.* 2011). Ces CMI sont très basses et permettent l'utilisation de ce conservateur à des proportions qui ne modifient pas les propriétés organoleptiques ou l'aspect des produits.

C'est un puissant allergène (Lundov, Krongaard *et al.* 2011) qui possède une toxicité élevée, entraînant une mort cellulaire *in vitro* au-delà de 100 mg/L (Figure 28) (Anselmi, Ettore *et al.* 2002; Schnuch, Mildau *et al.* 2011).

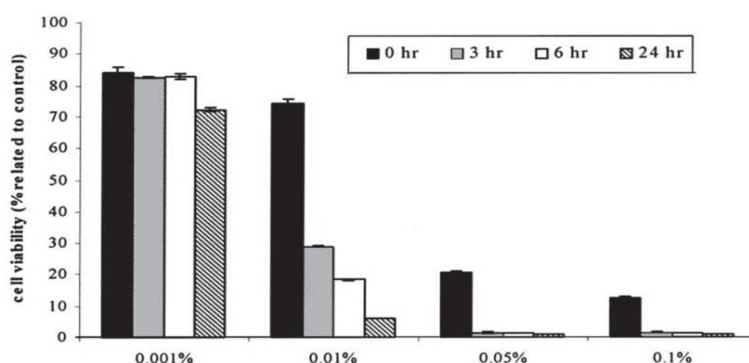
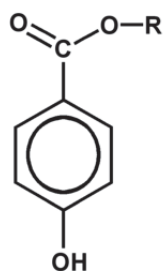


Figure 28 : Diagrammes de viabilité cellulaire après 0 à 24h d'exposition à différentes concentrations d'isothiazolinones (5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one). On remarque que la viabilité cellulaire décroît avec la concentration et le temps d'exposition avec les isothiazolinones (Anselmi, Ettore *et al.* 2002).

2.5.2.5. Les parabènes



Les parabènes sont des *para*-hydroxybenzoates d'alkyles (figure 29). Ils possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques, et sont utilisés comme conservateurs dans de nombreux produits de consommation et produits cosmétiques. L'Union Européenne permet l'utilisation des parabènes dans les produits cosmétiques avec une concentration maximale de chacun de 4 g/L et une concentration maximale totale en parabènes de 8 g/L (Règlement (CE) N°1223/2009 du parlement européen et du conseil).

Figure 29 Structure chimique du p-hydroxybenzoate d'alkyle (parabène)

❖ Mode d'action

Le mode d'action des parabènes n'a pas encore été clairement établi. Cependant, des études ont montré que les parabènes inhibaient le transport membranaire et le transfert d'électrons. D'autres études indiquent une fuite de composés intracellulaires (tel que l'ARN) vers le milieu extracellulaire, proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle du parabène testé, ce qui pourrait laisser penser à une perturbation de la membrane cellulaire (Davidson, Sofos *et al.* 2005). Pour aller plus loin, selon Nguyen *et al.*, le propyl- et l'éthyl-parabène ont un effet sur le canal mécanosensible de *Escherichia coli* (protéine intrinsèque de la membrane interne qui permet la régulation de la pression osmotique de la cellule) en activant l'ouverture de celui-ci et en provoquant ainsi une chute de la pression osmotique et une mort cellulaire (Nguyen, Clare *et al.* 2005).

❖ Propriétés

Les parabènes sont plus stables à un pH acide compris entre pH=3 et pH=6. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du propyl-parabène, par exemple, varient de 200 à 400 mg/L selon les souches de *Bacillus cereus*, et de 400 à 800 mg/L contre *Staphylococcus aureus*, mais il ne possède aucune activité inhibitrice contre *Pseudomonas fluorescens* (CMI >1600 mg/L) (Gutierrez-Larrainzar, Rua *et al.* 2013).

Ils sont facilement absorbés par voie cutanée, et sont retrouvés intacts dans certains tissus. Selon des études menées depuis 2004, les métabolites des parabènes peuvent jouer un rôle sur la perturbation endocrinienne observée expérimentalement sur des animaux. De plus, ils peuvent augmenter l'action de l'œstradiol endogène chez l'enfant (Boberg, Taxvig *et al.* 2010).

2.5.2.6. L'alcool benzylique

L'alcool benzylique (figure 30) (phénylméthanol) est un conservateur habituellement utilisé en cosmétique, et autorisé jusqu'à une concentration de 10 g/L (directive cosmétique 1223/2009), mais également en pharmacie pour la conservation des préparations injectables par voie parentérale (Meyer, Ni *et al.* 2007).

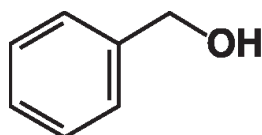


Figure 30 Structure chimique de l'alcool benzylique.

❖ Mode d'action

Chez *E. coli*, l'alcool benzylique agirait sur la perméabilité de la membrane plasmique, et inhiberait la synthèse d'ADN (Brannan 1997).

❖ Propriétés

L'alcool benzylique présente une concentration minimale inhibitrice de 25 mg/L contre *Staphylococcus aureus*, de 2000 mg/L contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, de 2500 mg/L contre *Candida albicans*, et de 5000 mg/L contre *Aspergillus niger* (Meyer, Ni *et al.* 2007). Il est incolore et hydrosoluble.

Comme les parabènes, il pourrait causer des allergies de contact lorsqu'il est concentré à 50 g/L dans le produit fini (Würbach, Schubert *et al.* 1993).

2.5.2.7. L'extrait de pépins de pamplemousse

L'extrait de pépin de pamplemousse a montré une activité antibactérienne, antivirale, antifongique, et antiparasitaire (Xu, Qu *et al.* 2007). Il contient une grande quantité de polyphénols, de catéchines, d'épicatéchines, et des procyanidines (Xu, Qu *et al.* 2007). Son efficacité est controversée car les extraits commerciaux ayant montré une efficacité antimicrobienne contiennent généralement d'autres conservateurs, tels que des parabènes ou des acides organiques. Par exemple, un extrait commercial (Bio/chem) présente une CMI de 15 mg/L contre *Salmonella*, et de 64 mg/L contre *Listeria monocytogenes* (Xu, Qu *et al.* 2007). Mais un extrait alcoolique préparé en laboratoire a montré une activité antimicrobienne beaucoup moins importante, comprise entre 40 et 160 g/L, contre 10

espèces de bactéries à Gram-positif, 10 espèces de bactéries à Gram-négatif, et 10 levures (Cvetnic and Vladimir-Knezevic 2004). L'extrait de pépins de pamplemousse seul présente donc bien une activité antimicrobienne mais à des concentrations élevées.

2.5.2.8. L'éthanol

L'éthanol est couramment utilisé en tant qu'antimicrobien, solvant, ou stabilisant, notamment dans les produits pharmaceutiques, à des concentrations variant de 1 % (v/v) à 96 % (v/v), et la majorité en contiennent environ 75 à 80 % (v/v). L'activité antibactérienne de l'éthanol peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que l'altération de la structure de la membrane plasmique (Fried and Novick 1973; Silveira, Baumgärtner *et al.* 2004), la perturbation de la division cellulaire (Fried and Novick 1973), une modification de la composition en acides gras et de la synthèse protéique (Chiou, Phillips *et al.* 2004), et dans le cas de *Bacillus subtilis*, il a été observé une inhibition de l'initiation de la sporulation pour des concentrations comprises entre 2,5 % et 70 % (v/v) (Gottig, Pedrido *et al.* 2005). L'éthanol semble efficace contre *E.coli* avec une CMI de 7,5 % (v/v) (Chiou, Phillips *et al.* 2004), et inhiberait la croissance de *L. monocytogenes* avec une CMI de 5 % (v/v) (Oh and Marshall 1993). *Oenococcus oeni* est une bactérie capable de se développer dans le vin, même en présence de 8 % d'éthanol. Elle résisterait à l'éthanol grâce à la présence de la protéine chaperonne Lo18, petite protéine de choc thermique (sHsp). Cette protéine serait capable dans un premier temps de préserver l'intégrité de la membrane plasmique lors d'une exposition à l'éthanol, et permettre ainsi à la bactérie de modifier sa composition en acides gras, puis dans un deuxième temps d'éviter l'agrégation des protéines cytoplasmiques (Maitre, Weidmann *et al.* 2014).

2.5.3. Les autres conservateurs

2.5.3.1. Les extraits végétaux, des composés actifs naturels

Les plantes comestibles, médicinales, et fraîches, ainsi que leurs huiles essentielles (et hydrolats coproduits), contiennent un grand nombre de métabolites secondaires qui sont réputés pour inhiber ou ralentir la croissance des bactéries, levures et moisissures (Burt and Reinders 2003; Chorianopoulos, Giaouris *et al.* 2008). Il s'agit par exemple des huiles essentielles, des polyphénols et des catéchines.

❖ Les huiles essentielles et leurs composés volatils

Les huiles essentielles des plantes et leurs constituants ont été depuis toujours largement utilisés comme agents de flaveur dans l'alimentation. Nombre d'entre eux ont un large spectre d'action antimicrobienne. Les composés antimicrobiens sont habituellement trouvés dans les huiles essentielles des feuilles (romarin, sauge, basilic, origan, thym, et marjolaine), bulbes (ail et oignon), graines (carvi, fenouil, noix de muscade, persil), rhizomes (ase fétide), fruits (poivre et cardamome) et d'autres parties de la plante (Burt 2004; Tiwari, Valdramidis *et al.* 2009).

Mécanisme d'action

L'action antimicrobienne des huiles essentielles ne serait pas attribuable à un seul mécanisme (Burt 2004; Calo, Crandall *et al.* 2015). Un facteur important de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est leur hydrophobicité, qui leur permettrait de s'intégrer et de s'accumuler dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires en la rendant plus perméable, et causant ainsi des fuites de matériel cellulaire (ions ou métabolites, par exemple ribose, ou Na-glutamate), puis une lyse et enfin la mort cellulaire (Smith-Palmer, Stewart *et al.* 1998; Burt 2004; Bakkali, Averbeck *et al.* 2008; Fisher and Phillips 2008; Calo, Crandall *et al.* 2015). Certains composés d'huiles essentielles semblent également perturber la synthèse des protéines et des acides nucléiques, mais également interférer avec le système de génération d'ATP (notamment par interaction avec les enzymes ATPase) en perturbant la chaîne de transport d'électrons (pompe à protons et pompe à électrons) (Burt 2004; Bakkali, Averbeck *et al.* 2008; Bajpai, Baek *et al.* 2012; Calo, Crandall *et al.* 2015). Une coagulation du cytoplasme et la formation de cloques à la surface des cellules peuvent aussi être observées (Gustafson, Liew *et al.* 1998; Calo, Crandall *et al.* 2015) (figure 31). La forte activité antibactérienne des composés phénoliques peut être due aux substituants alkyl autour du cycle phénolique (Calo, Crandall *et al.* 2015).

Les huiles essentielles sont en général décrites comme étant plus efficaces contre les bactéries à Gram-positif que contre les bactéries à Gram-négatif (Smith-Palmer, Stewart *et al.* 1998; Burt 2004; Kim, Kang *et al.* 2011; Bajpai, Baek *et al.* 2012; Calo, Crandall *et al.* 2015). L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif est composée de deux membranes (une interne et une externe), avec une mince couche de peptidoglycane (paroi) entre les deux. Elles apparaissent en rose après une coloration de Gram (Gram -). A l'inverse, les bactéries à Gram-positif ont une enveloppe composée d'une seule membrane interne, mais entourée d'une épaisse couche de peptidoglycane qui retient le colorant (cristal violet) et apparaissent en violet après une coloration de Gram (Gram +). Selon certains auteurs, la paroi moins

hydrophobe des bactéries à Gram-négatif les rendrait plus résistantes aux huiles essentielles, limitant leur pénétration dans le milieu intracellulaire décrite précédemment (Helander, Alakomi *et al.* 1998; Kim, Kang *et al.* 2011). Cependant, d'autres auteurs estiment que la différence de d'efficacité antimicrobienne entre ces deux types de bactéries ne peut pas être expliquée par la nature de l'enveloppe bactérienne, mais plutôt par sa conformation, les coques seraient moins sensibles aux huiles essentielles que les bacilles (Hajlaoui, Ben Abdallah *et al.* 2010; Nazzaro, Fratianni *et al.* 2013; Lopez-Romero, Gonzalez-Rios *et al.* 2015). Il existe tout de même plusieurs huiles essentielles efficaces contre les deux types de bactéries, comme par exemple l'origan, le clou de girofle, et la cannelle ainsi que des composés non phénoliques tels que l'isothiocyanate d'allyle (AIT) et l'huile d'ail (Tiwari, Valdramidis *et al.* 2009).

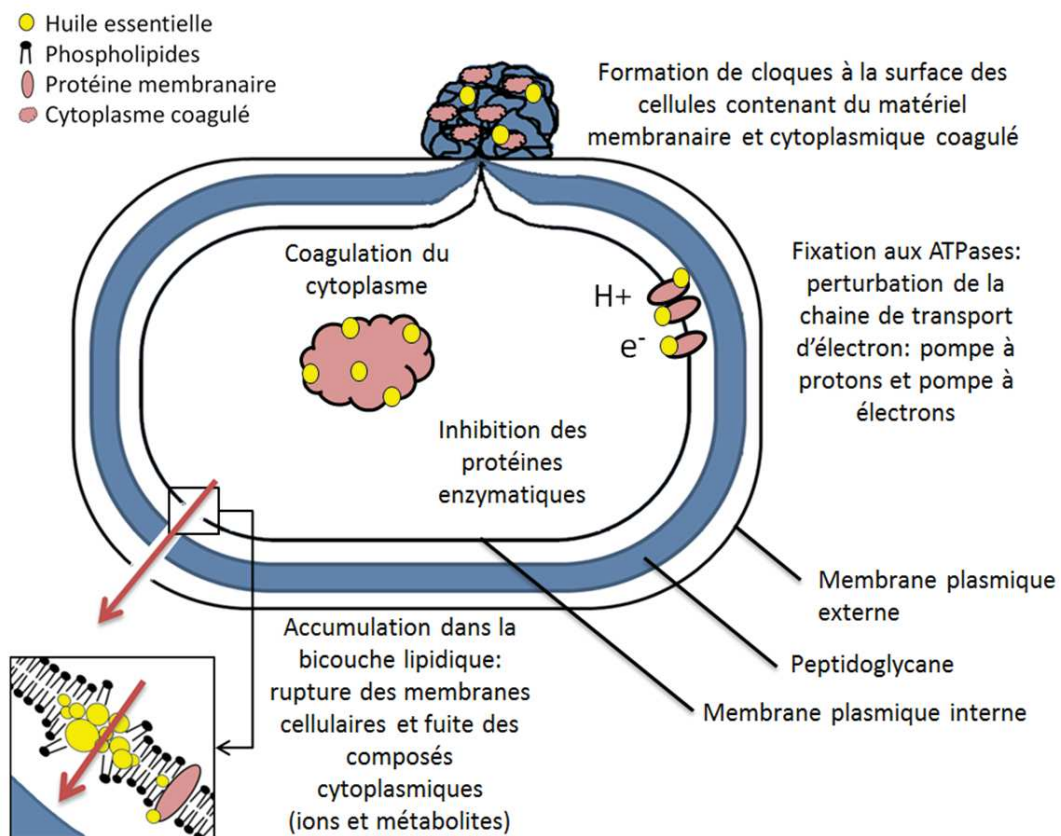


Figure 31 Schéma rassemblant les effets antimicrobiens des huiles essentielles sur la cellule bactérienne, exemple sur une bactérie à Gram-négatif. (Schema Cécile Labadie)

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et leurs composés volatils

Les huiles essentielles sont composées d'un mélange de composés volatils pouvant présenter une activité antimicrobienne. Par exemple, l'huile essentielle de rose a montré une activité antimicrobienne de 2500 mg/L contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, et *Chromobacterium violaceum*, et de 5000 mg/L contre *Staphylococcus aureus* et *Erwinia*

caratonova, mais l'hydrolat correspondant n'a pas montré d'activité antimicrobienne (Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009). L'analyse chimique des principaux constituants de la plupart des huiles essentielles antimicrobiennes révèle qu'elles sont composées majoritairement de carvacrol, de thymol, de citral et d'eugénol, ainsi que de leurs précurseurs, mais également de linalol, de géraniol et d' α -terpinéol (Smith-Palmer, Stewart *et al.* 1998; Burt 2004; Tiwari, Valdramidis *et al.* 2009). De même que les huiles essentielles, certains hydrolats présentent des activités antibactériennes. Il s'agit des hydrolats de thym, de sauge, d'ail (Al-Turki 2007), de sariette (Chorianopoulos, Giaouris *et al.* 2008) et d'origan (Sagdic and Ozcan 2003). Leur activité antibactérienne serait due à la présence de carvacrol et de thymol, ainsi que des composés diallyliques dans le cas de l'hydrolat d'ail (O'Gara, Hill *et al.* 2000; Sagdic and Ozcan 2003). L'activité antimicrobienne des composés volatils des hydrolats contre de nombreux microorganismes à Gram-positif et Gram-négatif a également été mise en évidence dans le cas de *Nepetta amethystina*. Ces composés volatils ont montré une meilleure activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram-positif que contre les bactéries à Gram-négatif (Bellahsene, Bendahou *et al.* 2015). Ainsi, ces activités antimicrobiennes peuvent être associées à la présence de certains composés tels que le farnésol, le linalol, et le géraniol, qui peuvent agir en synergie (Marino, Bersani *et al.* 2001).

Thymol et carvacrol

Le thymol et le carvacrol sont présents dans l'huile de thym, de romarin, mais également d'origan. Ils semblent efficaces à des concentrations minimales bactéricides relativement basses comprises entre 56 et 450 mg/L contre de nombreuses bactéries à Gram-positif et à Gram négatif, telles que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Listeria monocytogenes*, ainsi que contre la levure *Candida albicans* et la moisissure *Saccharomyces cerevisiae* (Tiwari, Valdramidis *et al.* 2009; Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011; Gutiérrez-Larraínzar, Rúa *et al.* 2012), Ils semblent également efficaces, seuls et mais également en synergie, pour le traitement de biofilms provenant de l'eau résiduaire produite dans l'industrie du papier (eau blanche) (Neyret, Herry *et al.* 2014). Enfin, l'utilisation de ces composés en concentration subléthale permettrait à certaines bactéries, telles que *Salmonella* Typhimurium, de s'adapter, par modification de la composition en acides gras de leurs membrane par exemple, ce qui aurait également pour conséquence de les rendre résistantes à d'autres conservateurs (Dubois-Brissonnet, Naïtali *et al.* 2011).

Les composés majoritaires des hydrolats : linalol, 2-phényléthanol, α -terpinéol et géraniol

Les composés majoritaires des eaux de fleur d'oranger présentent des activités antimicrobiennes pour des concentrations proches de celles observées dans les hydrolats. Par exemple, le linalol présente une concentration minimale inhibitrice comprise entre 200

et 900 mg/L contre de nombreuses bactéries telles que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Bacillus cereus* (Cosentino, Tuberoso *et al.* 1999; Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011). De même, le composé majoritaire des eaux de rose, le 2-phényléthanol, montre une concentration minimale inhibitrice de 200 mg/L contre *Escherichia coli* et *Ralstonia solanacearum* (Zhu, Zhou *et al.* 2011). De plus, l' α -terpinéol montre une concentration minimale bactéricide comprise entre 225 et 900 mg/L contre *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, et *Bacillus cereus*, mais également *Saccharomyces cerevisiae*, et *Candida albicans* (Cosentino, Tuberoso *et al.* 1999). Enfin, le géraniol présente une concentration minimale inhibitrice comprise entre 500 mg/L contre *Escherichia coli* et *Salmonella Typhimurium* et 1000 mg/L contre *L. monocytogenes* (Burt 2004).

Les extraits de romarin : acide rosmarinique et acide carnosique

Les extraits de romarin sont utilisés en agroalimentaire et leur utilisation peut être identifiée par leur numéro d'additif alimentaire E392. Ils présentent différentes activités biologiques. En effet, Cheung *et al.* ont montré *in vitro* un rôle inhibiteur de la prolifération cellulaire dans le cas de cancers du sein et de leucémies, ainsi qu'une activité antioxydante et anti-inflammatoire (Cheung and Tai 2007). Il a également été montré une augmentation de l'efficacité du cisplatine (médicament anticancéreux) dans le cas du cancer des ovaires (Tai, Cheung *et al.* 2012).

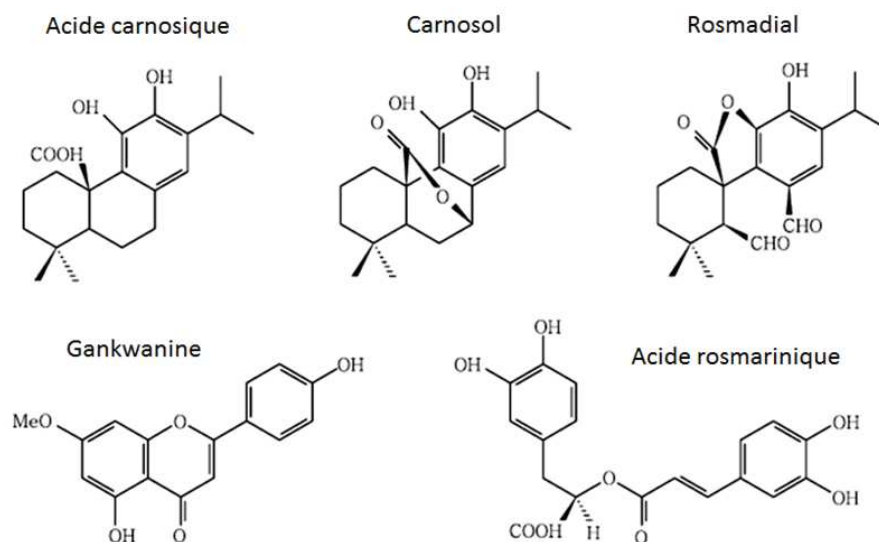


Figure 32 Structure chimiques des principaux composés présents dans l'extrait de feuilles de romarin.

La fraction apolaire des extraits de romarin seraient efficaces contre de nombreux microorganismes, tels que des bactéries à Gram-positif et des moisissures, mais pas contre les bactéries à Gram-négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, et *Erwinia caratovora*) ni contre les levures testées (*Rhodotorula glutinis* et *Cryptococcus laurentii*) (Del Campo, Amiot *et al.* 2000). Une faible température, un pH bas, et une forte concentration en NaCl

agiraient en synergie avec l'extrait éthanolique de l'extrait de romarin contre *Staphylococcus aureus*. De plus, la nature de la matrice aurait un effet sur l'activité antibactérienne. En effet, l'ajout de texturant (émulsifiant ou stabilisant d'émulsion), tel que l'ester diacétyltartrique de monoglycéride d'acide gras (DATEM : E 472^e), de protéines, telles que la serum albumine bovine, ou de produits laitiers, tels que les crèmes lactières ou le lait écrémé, abaissent la concentration minimale inhibitrice de l'extrait éthanolique de romarin (Del Campo, Amiot *et al.* 2000). Son activité antimicrobienne est donc variable selon les microorganismes testés et dépend également de la composition de la matrice dans laquelle il est ajouté.

L'acide rosmarinique est présent en grande proportion dans les extraits de romarin. Il possède une capacité antioxydante avec une IC₅₀ (concentration qui oxyde 50% de la quantité initiale de réactif) variant selon les études de 8 à 72 µM (Moreno, Scheyer *et al.* 2006; Mencherini, Picerno *et al.* 2007; Erkan, Ayranci *et al.* 2008). Il présente également une bonne activité antibactérienne sur certaines espèces telles que *Staphylococcus aureus* avec une concentration minimale inhibitrice de 5 mg/L (Moreno, Scheyer *et al.* 2006). Mais l'acide rosmarinique paraît avoir peu ou pas d'activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, et *Candida albicans*, contrairement à l'acide carnosique et au carnosol présents également dans les extraits de romarin (Moreno, Scheyer *et al.* 2006; Bernardes, Lucarini *et al.* 2010). Ses effets antimicrobiens sont donc contrastés, et paraissent beaucoup plus importants en synergie avec l'acide carnosique.

Pour conserver son étiquette de produit issu de l'agriculture biologique, l'extrait de romarin doit être extrait des plantes uniquement avec de l'éthanol (donnée Ecocert).

Les huiles essentielles, des extraits à utiliser avec précaution

Malgré leur étiquette « naturelle », certaines huiles essentielles peuvent être allergisantes, hallucinogènes, et/ou nocives pour la santé, et doivent être utilisées dans les proportions recommandées. Plusieurs d'entre elles font l'objet de restrictions de délivrance et d'autorisation de vente, elles appartiennent au monopole de la pharmacie, et ne peuvent pas être destinées à un usage alimentaire, cosmétique, ou de produit d'entretien, par le Décret n°2007-1221 du code de la santé publique. Il s'agit des huiles essentielles de grande et petite absinthe (*Artemisia absinthium* L. et *Artemisia pontica* L.) ; d'armoise commune, blanche, arborescente, (respectivement *Artemisia vulgaris* L. ; *Artemisia herba alba* Asso; *Artemisia arborescens* L.) ; de thuya du Canada ou cèdre blanc (*Thuja occidentalis* L.) et cèdre de Corée (*Thuja koraensis nakai*), dits "cèdre feuille" ; d'hysopé (*Hyssopus officinalis* L.) ; de sauge officinale (*Salvia officinalis* L.) ; de tanaisie (*Tanacetum vulgare* L.) ; de thuya (*Thuja plicata* Donn ex D. Don.) ; de sassafras (*Sassafras albidum* [Nutt.] Nees) ; de

sabine (*Juniperus sabina* L.) ; de rue (*Ruta graveolens* L.) ; chénopode vermifuge (*Chenopodium ambrosioides* L. et *Chenopodium anthelminticum* L.) ; et de moutarde jonciforme (*Brassica juncea* [L.] Czernj. et Cosson). De même, le méthyleugénol et l'estragole ne peuvent plus être utilisés en tant que tel dans les denrées alimentaires, et leur présence naturelle dans les mélanges aromatiques tels que les huiles essentielles est réglementée (Décision 2002/113/CE du 23 Janvier 2002). L'utilisation de certaines huiles essentielles est également déconseillée pour les enfants de moins de 3 ans, telles que l'huile essentielle camphrée ou l'huile essentielle d'eucalyptus. En effet, elles peuvent avoir des conséquences sur leur santé telles que des toux, des vomissements, des convulsions, et la léthargie pouvant aller jusqu'à la mort (Craig 1953; Flaman, Pellechia-Clarke *et al.* 2001). De plus, le comité scientifique pour la sécurité du consommateur a émis un rapport concernant l'utilisation de certaines substances aromatisantes au potentiel allergène dans les produits cosmétiques (SCCS 1459/11).

Les allergies provoquées par les huiles essentielles sont généralement cutanées, et causées majoritairement par les composés oxydés des huiles essentielles. Les huiles d'arbre à thé et de nigelle ont été les plus souvent mises en cause dans le cas d'allergies (Bourrain 2013). Les huiles essentielles s'oxydent en présence d'oxygène, et provoquent l'apparition d'hydroperoxydes. Les radicaux libres et les réactifs électrophiles peuvent ainsi réagir avec des macromolécules telles que des haptènes (élément constitutif d'un antigène : polysaccharides, ou peptides) pour former, lors de leur complexation, des antigènes induisant une réponse immunitaire, et provoquant ainsi une allergie. Par exemple, le géraniol et le linalol sont capables de s'auto-oxyder au contact de l'air pour former des hydroperoxydes au pouvoir allergène important (Hagvall, Bäcktorp *et al.* 2007).

❖ Les polyphénols

Les polyphénols sont une classe de composés présents chez tous les végétaux supérieurs. Ils jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les microorganismes pathogènes, ainsi que de nombreux stress abiotiques tels que les radiations ultraviolets (Daglia 2012). Ils sont divisés en deux catégories : les flavonoïdes, et les non-flavonoïdes. Les flavonoïdes contiennent les flavones, les flavonols, les dihydroflavonols, les flavanones, les aurones, les chalcones, et les dihydrochalcones, mais également les anthocyanidines, les flavan-3-ols, et les flavan-3,4-diols. Les non flavonoïdes sont composés d'acides phénoliques, tels que l'acide gallique, l'acide protocatechuique, ou encore les acides caféique et férulique, mais également les stilbènes et les lignanes. Nous nous concentrerons ici exclusivement sur les flavan-3-ols, également appelés catéchines.

Les catéchines sont constituées de trois cycles (A, B, et C) (Figure 33). Elles se différencient par la conformation des deux carbones asymétriques aux positions 2 et 3 et des groupements en R3 et R5'. Les catéchines présentées dans ce paragraphe sont décrites sur le tableau 8 et Figure 33.

Tableau 8 Structure chimique des catéchines d'intérêt

Catéchine	Configuration	R3	R5'
(+)-catéchine	2R, 3S	OH	H
(-)-épicatéchine	2R, 3R	OH	H
(-)-épigallocatéchine	2R, 3R	OH	OH
(-)-épicatéchine gallate	2R, 3R	G	H
(-)-épigallocatéchine gallate	2R, 3R	G	OH

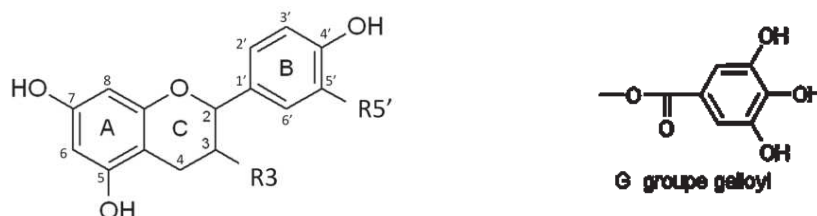


Figure 33 Structure chimique des principales catéchines. Elles comportent toutes la même structure de base et se différencient par conformation des carbones asymétriques en position 2 et 3 et la nature des groupements en R3 et R5'.

Mode d'action des catéchines

Il semblerait que l'action antibactérienne des catéchines citées ci-dessus soit due à la présence du groupement hydroxyle, ou d'un groupement O-acyl (tel que le galloyl) ou O-alkyl sur le carbone 3 du cycle C (en R3). De nombreux flavonoïdes, tels que l'épicatéchine gallate, provoqueraient l'agrégation des bactéries, soit par accumulation de plusieurs cellules, soit par l'incapacité des bactéries à se séparer après leur division. Cette agrégation bactérienne serait responsable d'une sous-estimation du dénombrement par comptage des colonies sur milieu gélosé (figure 34) (Cushnie and Lamb 2011).

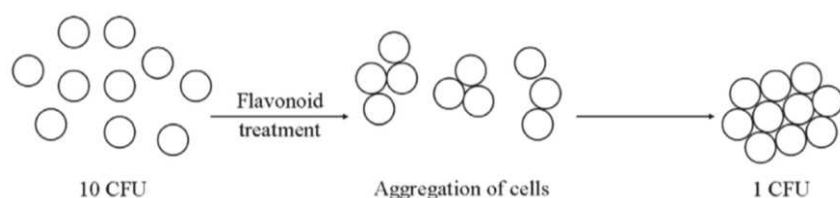


Figure 34 Cause de la sous-estimation du dénombrement bactérien causé par les flavonoïdes (Cushnie and Lamb 2011).

L'activité antibactérienne proprement dite serait provoquée par plusieurs mécanismes : une altération de la membrane plasmique ; une inhibition de la synthèse d'ADN et du métabolisme énergétique (Cushnie and Lamb 2011) ; l'altération de la membrane plasmique

et le passage de catéchines vers le milieu intracellulaire (Sirk, Brown *et al.* 2008) ; et une inhibition de l'ADN gyrase, essentielle à la réplication du chromosome circulaire chez les bactéries (Gradišar, Pristovšek *et al.* 2007).

Les polyphénols du thé (catéchines): épicatechine, épicatechinegallate, épigallocatechine, et épigallocatechine-3-gallate

Le thé est reconnu pour ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, mais également pour ses effets sur la santé humaine. Ses polyphénols ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes (Bansal, Choudhary *et al.* 2013).

L'épigallocatechine-3-gallate est le principal polyphénol présent dans le thé vert. Il présente une concentration minimale inhibitrice de 64 mg/L contre *Staphylococcus aureus*, et un effet de synergie en présence d'acide ascorbique (à 64 mg/L) avec une concentration minimale inhibitrice réduite à 32 mg/L (Hatano, Tsugawa *et al.* 2008). Ikigai *et al.* ont montré une concentration minimale inhibitrice de 73 mg/L contre *Staphylococcus aureus* et de 573 mg/L contre *E.coli* (Ikigai, Nakae *et al.* 1993). De même, une concentration de 100 mg/L permet d'éliminer 90 % de la population de *Helicobacter pylori* (Yanagawa, Yamamoto *et al.* 2003).

Jung-sook *et al.* ont montré que l'épicatechine et l'épigallocatechine ont une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI comprise entre 12,5 mg/L, et l'épicatechine possède une concentration minimale inhibitrice de 25 mg/L contre *Pseudomonas aeruginosa*. De même, l'épicatechinegallate et l'épigallocatechine-3-gallate présentent une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* avec une CMI de 12,5 mg/L. De plus, l'épicatechinegallate possède une CMI de 12,5 mg/L contre *Enterobacter cloacae* (Jung-Sook and Ha-Sook 2007).

2.5.3.2. Les acides organiques

❖ Mode d'action des acides organiques

La membrane cellulaire est imperméable aux acides ionisés, sous leur forme dissociée, $A^- + H^+$. Les acides organiques sont plus efficaces contre les microorganismes sous leur forme non dissociée (AH) (Kier, Cheng *et al.* 1998; Le Marc, Huchet *et al.* 2002; Beales 2004). En effet, sous cette forme, ils ont la capacité de traverser la membrane plasmique par diffusion passive (De Reynal 2009).

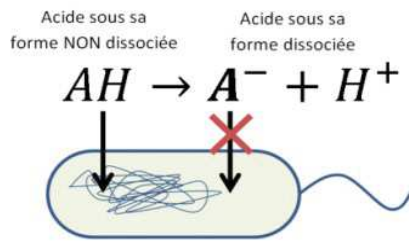


Figure 35 Capacité de pénétration des acides sous leur forme dissociée ou non dissociée dans la cellule bactérienne

Le pH du milieu intracellulaire est supérieur au pKa des acides organiques. Une fois à l'intérieur de la cellule, les acides organiques se dissocient. La cellule bactérienne a la capacité d'expulser les ions H^{+} du milieu intracellulaire à l'aide d'ATPases (pompe à proton-potassium par exemple). Cette étape demande beaucoup d'énergie à la cellule bactérienne, et lorsque celle-ci a épuisé ses réserves, elle ne peut plus contrôler son pH interne et les protons s'accumulent jusqu'à l'équilibre du pH intracellulaire et extracellulaire, ce qui

provoque la mort du microorganisme (Krebs, Wiggins *et al.* 1983; Brul and Coote 1999; Beales 2004). L'efficacité des acides organiques ne peut pas être expliquée exclusivement par la concentration en formes non dissociées, mais également par le type d'acide utilisé. La baisse brutale du pH intracellulaire, la rupture de la membrane plasmique, l'inhibition de réactions métaboliques essentielles et l'accumulation d'anions toxiques dans le cytoplasme permettent d'expliquer l'inhibition de la croissance bactérienne par les acides organiques (Brul and Coote 1999).

Pour connaître la concentration en formes dissociées et non dissociées d'un acide selon le pH, on utilise la formule suivante :

$$pH = pKa + \log \frac{[A^{-}]}{[AH]} \text{ (mol/L)}$$

Lorsque le pH du milieu est égale au pKa de l'acide, les formes dissociée et non dissociée sont en concentration égale (mol/L) dans la solution. Dans le cas où le pH de la solution est supérieur au pKa de l'acide organique, sa forme dissociée est prédominante; et à l'inverse, lorsque $pH < pKa$, c'est la forme non dissociée qui est prédominante dans la solution (soit AH). Les acides organiques sont donc beaucoup plus efficaces dans des solutions à pH acide, inférieures à leur pKa. Le choix du pH lors de l'utilisation des acides est donc un critère très important.

❖ Acide déhydroacétique

L'acide déhydroacétique et son sel de sodium sont utilisés pour la conservation des produits cosmétique à une concentration maximale de 6 g/L et autorisé en agroalimentaire aux Etats-Unis par la FDA à une concentration maximale de 65 mg/L (Food and Drug Administration, N° 21CFR172.130). Ils possèdent respectivement les numéros d'additif alimentaire E265 et

E266, mais ne sont pas listés dans les réglementations de l'Union Européenne ni dans l'OMS. Ils sont habituellement utilisés en association avec l'alcool benzylique dans la préparation commerciale appelée « Cosgard » (permis en tant qu'additif dans les cosmétiques biologiques). Sa constante de dissociation est $pK_a=5,27$.

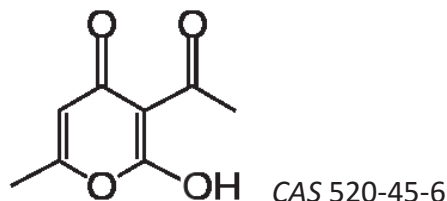


Figure 36 Structure chimique de l'acide déhydroacétique

L'acide déhydroacétique présente par exemple une CMI de 4 g/L contre *Escherichia coli* O157:H7 dans un milieu de culture défini mais également dans un modèle alimentaire, à $pH=6,5$ (Davidson, Sofos *et al.* 2005). Dans un milieu de culture défini, à $pH=5$, il présente une activité antifongique de 500 mg/L contre de nombreuses moisissures dont *Aspergillus niger* (Huang, Wilson *et al.* 2010). Il ne semble pas être irritant pour la peau lors d'essais sur des lapins, y compris lors d'un contact prolongé. Il a montré un effet toxique, perte de poids et altération des organes internes, chez le rat à une concentration de 300 mg/kg pendant 34 jours, mais aucun effet toxique n'a été observé chez le singe à des doses de 50 à 100 mg/kg données cinq fois par semaines pendant un an (Davidson, Sofos *et al.* 2005).

❖ Acide férulique

L'acide férulique n'est pas listé en tant qu'additif alimentaire ni cosmétique, il n'est donc pas autorisé dans l'alimentation ni en additif cosmétique, mais il semble prometteur en tant qu'antimicrobien naturel. C'est un acide hydroxycinnamique qui possède une constante de dissociation de $pK_a=4,58$. Il a été étudié pour ses nombreuses fonctions physiologiques telles que ses capacités antioxydante, anti-inflammatoire, anti-thrombose et anticancéreuse. Il possède un large spectre d'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram-positif et Gram-négatif, ainsi que contre les levures et moisissures, mais moins importante que le sorbate de potassium (Brand-Williams, Cuvelier *et al.* 1995; Ou and Kwok 2004). Lemos *et al.* ont constaté une concentration minimale inhibitrice de 500 mg/L sur *B. cereus* et *P. fluorescens* (Lemos, Borges *et al.* 2014).

❖ Acide sorbique et sorbates / acide benzoïque et benzoates

L'acide sorbique est utilisé en agroalimentaire sous le numéro E200, ainsi que ses sels : sorbates de sodium, potassium et calcium (respectivement E201, E202, et E203)

L'acide sorbique est peu soluble dans l'eau (1,6 g/L à 20°C), contrairement au sorbate de potassium (582 g/L à 20°C) et au sorbate de sodium (320 g/L). Ce sont donc ces deux derniers qui sont majoritairement utilisés. Comme la plupart des acides organiques, il semble ne pas avoir d'impact sur la saveur (Luck and Jager 1997; Davidson, Sofos *et al.* 2005). Il présenterait des effets antimicrobiens à faible concentration. Par exemple, dans le vin il suffit de 270 mg/L de sorbate de potassium pour inhiber la croissance bactérienne totale, et une concentration de 200 mg/L pour éviter la croissance des moisissures dans des boissons non alcoolisées (Davidson, Sofos *et al.* 2005). Il est souvent utilisé en association avec l'acide benzoïque ou les benzoates, et est soumis à la réglementation.

L'acide benzoïque et ses sels sont utilisés en agroalimentaire sous les numéros E210 à E213. Sa concentration minimale inhibitrice en forme non-dissociée a été mesurée à 0,5 mmol/L contre *Bacillus cereus*, 1,2 mmol/L contre *Escherichia coli*, et 9,5 mmol/L contre *Staphylococcus aureus* par exemple (Eklund 1985). Il semble présenter un faible effet génotoxique sur les lymphocytes humains *in vitro* (Yılmaz, Ünal *et al.* 2009).

❖ Acide lactique et lactates

L'acide lactique est utilisé en agroalimentaire sous le numéro E270.

Adams *et al.* ont montré que l'acide lactique est moins efficace que l'acide acétique. L'acide lactique inhibe la croissance de *E. coli* et *Salmonella Enteridis* à 37,8 mmol/L de forme non dissociée (Adams and Hall 1988). Dans le cas de tests sur des laitues, l'acide lactique paraît avoir une meilleure activité antimicrobienne contre *E. coli* lorsqu'il est associé à l'acide malique, avec une réduction d'environ 4,0 log₁₀ UFC/mL (Vijayalakshmi, Hettiarachchy *et al.* 2012). Des études sur *Vibrio parahaemolyticus* ont montré que l'acide lactique possède une activité bactéricide comparable au chloramphénicol (antibiotique), avec une concentration minimale bactéricide de 0,78 g/L (Chun-Hoong, Noryati *et al.* 2010).

❖ Acide citrique et citrates

L'acide citrique est utilisé en agroalimentaire sous le numéro E330. Il est également possible d'utiliser ses sels : citrate de sodium, potassium, et calcium (respectivement E331, E332 et E333).

L'acide citrique peut être utilisé en soin hospitalier pour traiter les infections à *Pseudomonas aeruginosa* (Nagoba, Deshmukh *et al.* 1998; Nagoba, Gandhi *et al.* 1998). L'acide citrique est également utilisé pour assainir les systèmes de purification d'eau en hôpital, il paraît efficace contre de nombreuses bactéries à Gram-négatif. *Pseudomonas fluorescens* paraît tout de même moins affecté par l'acide citrique que les autres bactéries Gram-négatif (Mazzola, Martins *et al.* 2006). L'acide citrique est également utilisé comme antioxydant. En combinaison avec l'acide rosmarinique, on observe un effet de synergie, augmentant ainsi sa capacité antioxydante (Rizner Hras, Hadolin *et al.* 2000). Les sels d'acide citrique (citrates), ont la capacité de chélater des ions métalliques. Le transport de ces métaux à travers la membrane plasmique peut être diminué par la formation de complexes métal-citrate, ce qui peut donc inhiber certaines fonction métaboliques essentielles (Bergsma and Konings 1983; Joshitope and Francis 1995; Brul and Coote 1999).

❖ Acide malique et malates

C'est un acide organique couramment utilisé dans l'industrie agroalimentaire sous le numéro de conservateur E296 ainsi que ses sels de sodium, potassium, et calcium (E350, E351 et E352 respectivement).

L'acide malique semble plus efficace en association avec l'acide lactique (30 g/L chacun) contre *E. coli*. avec une réduction de 4,0 log₁₀ UFC/mL (Vijayalakshmi, Hettiarachchy *et al.* 2012). Ajouté séparément dans le milieu, les résultats montrent que l'acide malique à 20 g/L est plus efficace que l'acide citrique et l'acide lactique dans le cas du traitement de feuilles de laitue (Park, Choi *et al.* 2011). Dans les jus de fruits, aucune de ces trois bactéries testées, *L. monocytogenes*, *S. Enteridis*, et *E. coli*, ne survit après ajout de 15 g/L d'acide malique après quatre jours (Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar *et al.* 2009). De même, l'étude microbiologique d'une eau de vase de fleurs coupées montre que l'ajout d'acide malique diminue fortement la population microbienne (Kazemi, Zamani *et al.* 2011).

2.5.3.3. Les peptides antimicrobiens

Les peptides sont des protéines de petite taille formées par l'assemblage de moins de 100 aminoacides. Les peptides antimicrobiens possèdent pour la plupart un maximum de 50 aminoacides. Ils ont un rôle aussi bien antibiotique, qu'antifongique et antiviral. De nombreuses recherches sont en cours pour déterminer leur rôle et leurs effets sur la santé humaine (Boman 2003; Andrès and Dimarcq 2007; Michel 2010). En effet, il est important de savoir si une résistance peut être acquise par les bactéries envers ces peptides antimicrobiens. Parmi ces peptides antimicrobiens, la Nisine est utilisée en agroalimentaire sous le numéro de conservateur E234. La dose journalière admissible (DJA) est fixée à 0,13 mg de nisine/kg de pc/jour par le SCF (EFSA 2006). Selon la thèse d'Anne-Sophie Michel sur les peptides antimicrobiens, *Burkholderia sp* serait résistante aux PAM (Michel 2010).

Ceci est une liste non-exhaustive de conservateurs destinés à l'industrie cosmétique et/ou agroalimentaire. Elle présente seulement les composés ayant des propriétés physico-chimiques (solubilité, couleur) pouvant être compatibles avec une utilisation dans les hydrolats. Bon nombre d'entre eux seront donc testés en tant qu'additif antimicrobien lors de cette étude.

3. Problématique

Des hydrolats traités ou réceptionnés au sein de la société Albert Vielle sont régulièrement l'objet d'une non-conformité aux standards internes de la société ou de clients en raison d'une contamination bactérienne, et/ou un changement de flaveur, et/ou un changement de couleur. L'eau de fleur d'oranger peut prendre par exemple une teinte marron/brunâtre lorsque sa conservation se prolonge. Lorsqu'ils sont non conformes, les lots d'hydrolats sont soit éliminés, soit redistillés. Chaque lot contient entre 200 et 8000 L d'hydrolat, le manque à gagner est donc important. Les causes de telles altérations ne sont pas connues à ce jour.

L'objectif du projet est donc de proposer une méthode de stabilisation des eaux florales par l'utilisation de méthodes et/ou de molécules naturelles, mais également d'avoir une meilleure connaissance de la microflore et de ses dynamiques de croissance dans cet environnement à la fois oligotrophe et contenant des composés volatils à potentiel antimicrobien. La mise en œuvre de méthodes de stabilisation nécessite également une bonne connaissance de l'environnement chimique des hydrolats. Or il s'avère que les données sont rares et disparates. Les travaux conduits sur les huiles essentielles sont difficilement transposables : les phases aqueuses présentent vraisemblablement des profils très différents. Elles sont plus favorables à la croissance microbienne (mais de quels micro-organismes, avec quels nutriments disponibles ?). Un préalable nécessaire à la maîtrise de la qualité des hydrolats est une connaissance améliorée de leurs différents composants, chimiques et microbiologiques, et de leur variabilité au cours du temps.

Les techniques de conservation à mettre en œuvre doivent donc répondre à plusieurs contraintes : (i) préserver la finesse et la typicité aromatique des eaux florales, (ii) correspondre aux attentes actuelles des utilisateurs, i.e. favoriser l'utilisation de molécules « naturelles » à image plus favorable que les conservateurs les plus couramment utilisés (parabènes par exemple), (iii) répondre aux exigences du cahier des charges de la certification biologique et (iv) représenter un coût d'application compatible avec la relativement faible valeur commerciale des eaux florales.

L'approche proposée dans le projet prend en compte (i) la durée de vie du produit dans sa totalité depuis la transformation jusqu'à son utilisation finale, (ii) ses qualités d'usage, i.e. profil aromatique et satisfaction aux critères microbiologiques et (iii) s'inscrit dans une perspective de durabilité (maîtrise par des méthodes naturelles et douces non dénaturantes).

Ce travail de thèse sera présenté en 3 parties. Une première partie destinée à explorer la composition chimique et microbiologique des hydrolats ainsi que le comportement et l'impact des microorganismes. Ceci dans le but de comprendre comment de tels milieux,

théoriquement hostiles à la présence de microorganismes, peuvent être contaminés. Nous nous poserons ainsi ces questions : est-ce une contamination importante ponctuelle ? Est-ce que les microorganismes peuvent se multiplier ou non dans les hydrolats ? Quels peuvent être les substrats de croissance de ces microorganismes ? Une deuxième partie sera destinée à la recherche d'une stabilisation adaptée et à l'impact des antimicrobiens testés sur le comportement bactérien. Enfin une troisième partie nous permettra de conclure le travail effectué et de discuter des solutions permettant d'atteindre notre objectif.

4. Matériel et Méthodes

4.1. Origine des échantillons d'hydrolats analysés

Nous avons analysé deux types d'eaux florales : 12 échantillons d'eau de rose (6 de *Rosa damascena* Miller et 6 de *Rosa centifolia* L.) et 10 échantillons d'eau de fleur d'oranger (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.). Ces hydrolats ont été fournis par de nombreux fournisseurs autour du bassin méditerranéen, via la société Albert Vieille SAS (tableau 11). Tous ces hydrolats sont conformes aux pratiques usuelles du marché. Ils ont été produits par entraînement à la vapeur ou hydrodistillation de fleurs fraîches. Une seconde distillation peut être effectuée en cas de non-conformité du produit avec les standards de qualité organoleptique ou microbiologique. Des échantillons de 5 à 10 L ont été prélevés à différents moments pendant le procédé de production ou le stockage (figure 37). Ensuite, des échantillons de 50 à 100 mL ont été prélevés stérilement afin d'effectuer les analyses chimiques et microbiologiques. Parmi ces échantillons, deux échantillons d'eau de rose de mai (*Rosa centifolia*) (échantillons #18 et #22) et deux échantillons d'eau de fleur d'oranger (échantillons #7 et #8), ont été prélevés en bouteille stérile de capacité 10 L, dans la cuve de stockage ou la cuve de transfert quelques jours après la distillation. Ils ont ensuite été stockés à 5°C (échantillons #18.1, #22.1, #7.1, and #8.1), ou à température ambiante (environ 21°C) (échantillons #18.2, #22.2, #7.2, and #8.2). L'évolution de la population bactérienne a été analysée par échantillonnage régulier de 50 mL en conditions aseptiques, pendant une période minimale de 3 mois. De même, les échantillons de rose de mai #17 et #21.1 et #21.2 ont été prélevés en sortie d'essencier, avant d'être versés dans la cuve de stockage, puis l'évolution de leur population microbienne a été suivie pendant une période d'au moins 3 mois.

En parallèle, 200 g de fleurs fraîches de rose de mai, utilisées pour la production de l'hydrolat #17, ont été échantillonnées avant distillation et leur population microbienne, bactéries, levures et moisissure, a été dénombrée.

4.2. Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés dans cette thèse, dérivent tous du milieu de culture Plate count agar (PCA) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France), à l'exception du dénombrement des levures et moisissures qui a été effectué sur du milieu de culture gélosé Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France). Tous ces milieux ont été préparés dans l'eau déminéralisée, puis autoclavés à 121°C pendant 20 minutes. Du milieu de culture le plus concentré au milieu de culture le plus dilué, nous avons:

YGC : milieu de culture Yeast Glucose Chloramphénicol (YGC) (Biokar Diagnostic). Ce milieu de culture a été utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures.

PCA : milieu de culture gélosé Plate Count Agar (PCA) (Biokar Diagnostic). Ce milieu a été utilisé pour la recherche des meilleures conditions de culture des bactéries aérobies totales présentes dans les hydrolats (paragraphe 5.1.1).

PCA10 : il s'agit du milieu de culture gélosé PCA dilué d'un facteur 10 (Biokar Diagnostic), complété en agar (Biokar Diagnostic) afin d'obtenir une concentration finale de 12 g/L en agar. Ce milieu de culture a été utilisé pour tous les dénombrements bactériens, ainsi que pour les précultures des souches bactériennes, levures et moisissures.

PCB5 : il s'agit d'un milieu de culture liquide ayant la même composition que le milieu de culture PCA dilué d'un facteur 5, dans lequel il n'y a pas d'agar. Il est composé de 1000 mg/L de tryptone (Biokar Diagnostic) ; 500 mg/L d'extrait autolytique de levure (Biokar Diagnostic) ; et de 200 mg/L de D-(+)-glucose (Sigma Aldrich). Ce milieu a été utilisé lors des tests de croissance bactérienne avec différents conservateurs.

PCB10 : il s'agit d'un milieu de culture liquide ayant la même composition que le milieu de culture PCA dilué d'un facteur 10, dans lequel il n'y a pas d'agar. Il est composé de 500 mg/L de tryptone (Biokar Diagnostic) ; 250 mg/L d'extrait autolytique de levure (Biokar Diagnostic) ; et de 100 mg/L de D-(+)-glucose (Sigma Aldrich). Ce milieu a été utilisé pour des précultures et des cultures en milieu liquide. Il nous a permis d'effectuer des mesures spectrophotométriques des bactéries d'intérêt, tout en étant adapté à leur culture en conditions oligotrophes.

PCB100 : il s'agit d'un milieu de culture liquide ayant la même composition que le milieu de culture PCA dilué d'un facteur 100, dans lequel il n'y a pas d'agar. Il est composé de 50 mg/L de tryptone (Biokar Diagnostic) ; 25 mg/L d'extrait autolytique de levure (Biokar Diagnostic) ; et de 10 mg/L de D-(+)-glucose (Sigma Aldrich). Ce milieu, ayant une quantité de matière sèche comparable aux hydrolats, a été utilisé pour les précultures des bactéries avant leur inoculation dans les hydrolats, afin de mieux les adapter aux conditions oligotrophes.

PCB300 : il s'agit d'un milieu de culture liquide ayant la même composition que le milieu de culture PCA dilué d'un facteur 300, dans lequel il n'y a pas d'agar. Il est composé de 16,7 mg/L de tryptone (Biokar Diagnostic) ; 8,3 mg/L d'extrait autolytique de levure (Biokar Diagnostic) ; et de 3,3 mg/L de D-(+)-glucose (Sigma Aldrich). Ce milieu permet d'obtenir des populations maximales comparables à celles observées dans les hydrolats, entre 6,5 et

7,5 log₁₀ UFC/mL. Il a été utilisé pour les essais de viabilité des bactéries dans différentes conditions de températures.

Contrairement au milieu de culture PCB10, Les populations bactériennes des milieux de culture PCB100 et PCB300 ne sont pas suffisamment concentrées pour permettre des mesures par spectrophotométrie (A₆₀₀).

4.3. Analyse de la composition chimique et microbiologique des hydrolats

4.3.1. Analyses chimiques

4.3.1.1. Extraction, identification et quantification des composés volatils

Les composés volatils ont été extraits à partir d'un volume de 4 mL d'hydrolat, versé dans un tube à essai en verre, par 3 extractions liquide-liquide successives à l'hexane (n-hexane, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), avec ajout d'un étalon interne, le n-hexadécane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Pour cela, un volume de 1,5 mL de phase organique (n-hexane) a été versé dans le tube à essai contenant les 4 mL d'hydrolat et l'étalon interne. Le mélange a été vortexé environ 10 secondes, puis après décantation, la phase organique a été séparée dans un autre tube à essai en verre à l'aide d'une pipette pasteur également en verre. L'extraction a été répétée 3 fois. Les traces d'eau persistant dans la phase organique ont ensuite été éliminées par séchage au Na₂SO₄ (VWR), puis la phase organique a été filtrée au travers d'un coton de verre préalablement lavé à l'hexane. Un volume de 1mL de phase organique, contenant les composés volatils, a ensuite été inséré dans un vial et analysé par Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GCMS-QP 2010; Shimadzu, Kyoto, Japon). Les échantillons ont été injectés par un injecteur automatique (AOC-5000; Shimadzu), en mode splitless, à 250°C. La purge a été ouverte après 0,5 minutes. Les composés ont été séparés par une colonne capillaire UBWAX (30 m × 0,25 mm, 0,5 µm) (Interchim, Montluçon, France). Le gaz vecteur utilisé a été l'hélium, à une vitesse constante de 35,5 cm/s. La programmation de température du four a été la suivante : température initiale de 50°C, puis 4°C par min jusqu'à 230°C, et enfin 5 minutes à 230°C (hold time). La détection a été effectuée par un spectromètre de masse à impact électronique à 70 eV, pour des masses (m/z) comprises entre 29 et 450, à une vitesse de 1,7 scans/s. La température de la source ionique était de 200°C et celle de la ligne de transfert était de 250°C.

L'identification des composés a été effectuée par comparaison des spectres de masse obtenus avec les spectres de masse des bases de données Wiley Mass Spectral library (8th edition) et NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 08). L'identification a été confirmée par la détermination des indices de rétention expérimentaux (RI) de 31 composés, par injection d'une solution de n-alcanes (C7-C30) (Supelco, Bellefonte, Etats-unis), puis comparés aux valeurs données par la littérature (www.pherobase.com and www.flavornet.org).

La quantification a été effectuée par comparaison des aires des pics des composés volatils avec un standard interne, le n-hexadécane (Sigma-Aldrich) ajouté dans chaque échantillon avant extraction, par mesure du coefficient de réponse de solutions de linalol, α -terpinéol, citronellol, nérol, et géraniol (tous provenant de Sigma-Aldrich), ainsi que du 2-phenyléthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne), avec le n-hexadécane. Ces composés représentaient respectivement 85% et 75% des composés volatils des eaux de rose et eaux de fleur d'oranger. La concentration en composés volatils, exprimée en mg/L ou en % d'aire des pics, correspond à la moyenne de deux réplicats d'extractions. La reproductibilité des extractions, estimée par l'écart moyen absolu, est inférieure à 5,3% pour la concentration totale en composés volatils, et inférieure à 3,4% pour les pourcentages d'aires des pics. La quantification a été faite dans un premier temps par GC-FID (Clarus 500, Perkin-elmer ; Waltham, Massachusetts, États-Unis), mais pour des raisons techniques, la quantification a été poursuivie et transposée sur GC-MS tel que décrit ci-dessus.

4.3.1.2. Détermination du pH

Le pH des hydrolats a été mesuré à température ambiante à l'aide d'une électrode de pH (Hanna, Tanneries, France) équipée sur un pHmètre (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). Le pHmètre a été calibré chaque jour par des solutions tampons (pH 4,00 et pH 7,01) (Merck).

4.3.1.3. Détermination de la concentration en glucides

Pour chaque analyse, un volume de 50 mL d'hydrolat a été lyophilisé dans un bécher de capacité 100 mL. La concentration en glucides a été déterminée par la méthode du phénol-acide sulfurique (Dubois, Gilles *et al.* 1956) sur les résidus secs après lyophilisation. Les résidus secs ont ainsi été solubilisés dans 0,5 mL d'eau ultra-pure (MilliQ plusTM, Merck Millipore, Billerica, Etats-Unis), 0,5 mL d'une solution de phénol concentrée à 50 g/L (Fisher Scientific, Illkirch, France), et 2,5 mL d'acide sulfurique pur (VWR). L'absorbance à 485 nm (A_{485}) a été déterminée après 30 minutes de réaction, dans une cuve en quartz de largeur

1 cm, en utilisant un spectrophotomètre (Xenius, Safas, Monaco). La calibration a été faite avec des solutions de saccharose (Sigma-Aldrich) préparées dans l'eau ultra-pure (MilliQ plusTM, Merck Millipore) à 7 concentrations différentes comprises entre 0,01 g/L et 0,08 g/L de saccharose ($R^2 = 0,99$).

4.3.1.4. Détermination de la concentration en acides aminés

La concentration en acides aminés a été déterminée par dosage colorimétrique sur microplaque 96 puits, adapté de méthodes déjà publiées (Frutos, Torrado *et al.* 2000; Sun, Lin *et al.* 2006). La courbe de calibration et les échantillons ont été préparés au même moment. La calibration a été faite avec 6 solutions de glycine (Sigma-Aldrich), préparées dans l'eau ultra pure (MilliQ plusTM, Merck Millipore), aux concentrations comprises entre 0,06 g/L et 0,105 g/L ($R^2 = 0,99$). Au-delà de ces concentrations, la courbe de calibration n'est plus linéaire. Des échantillons de 50 mL d'hydrolats ont été lyophilisés dans des béchers de capacité 100 mL. Les résidus secs après lyophilisation ont ensuite été dissous dans 1 mL d'eau ultra pure (MilliQ plusTM, Merck Millipore). Deux aliquotes de 400 μ L de chaque échantillon dissous ont été transférés chacun dans un microtube à bouchon vissé. Le premier aliquote, utilisé comme contrôle, a été additionné de 200 μ L d'eau ultra-pure (MilliQ plusTM, Merck Millipore). Dans le deuxième aliquote, on a ajouté un volume de 200 μ L de solution de Ninhydrine (Sigma-Aldrich) concentrée à 20 g/L dans l'eau ultra pure (MilliQ plusTM, Merck Millipore). Tous les microtubes ont ensuite été fermés hermétiquement, et chauffés à 95°C au bain sec (Lab-line, Maharashtra, Inde). Après 15 minutes de chauffe, les échantillons ont été immédiatement refroidis dans la glace et vortexés pendant 10 secondes. Puis, un volume de 300 μ L de chaque échantillon et solution de calibration a été transféré dans une microplaque 96 puits (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France). L'absorbance à 570 nm a été déterminée par mesures spectrophotométriques (Xenius, Safas) dans un laps de temps maximal de 20 minutes après la chauffe. Au-delà de cette période, l'absorbance diminue de manière significative.

4.3.1.5. Distillation de solutions de composés non-volatils en laboratoire.

Nous avons distillé 3 solutions de composés non-volatils préparées dans l'eau ultra pure (MilliQ plusTM, Merck Millipore) toutes concentrées à 20 g/L. Il s'agissait tout d'abord d'un volume de 50 mL d'une solution d'extrait autolytique de levure (Biokar Diagnostic, Beauvais, France), puis de 50 mL d'une solution de glycine (Sigma-Aldrich), et enfin de 100 mL d'une solution de saccharose (Sigma-Aldrich). Pour cela, nous avons utilisé un ballon tricol de

capacité 500 mL, monté sur un chauffe-ballon équipé d'un agitateur magnétique ; une tête de distillation équipée d'un thermomètre et un réfrigérant muni d'un circuit d'eau froide. La distillation a été arrêtée lorsque 80% du volume a été distillé. Le distillat a été récupéré dans une éprouvette graduée. Le poids sec du distillat de l'extrait autolytique de levure a été déterminé après 3 jours de séchage au four à 73°C. La concentration en acides aminés dans le distillat de la solution de glycine et la concentration en glucides dans le distillat de la solution de saccharose ont été déterminées par dosage colorimétrique selon les méthodes décrites précédemment (paragraphes 4.3.1.3 et 4.3.1.4). Les distillations d'extrait autolytique de levure et de glycine ont été répétées trois fois, la distillation de saccharose a été effectuée une fois.

4.3.1.6. Analyse des composés non volatils dans les hydrolats avant et après contamination

Nous avons voulu connaître l'impact des bactéries sur les composés non-volatils des hydrolats, et leurs produits de métabolisation. Pour cela, une partie des échantillons a été filtrée à 0,22 µm dès la réception de l'hydrolat au laboratoire puis conservée dans les mêmes conditions de température que l'échantillon non filtré. Ainsi, nous avons analysé 2 types d'échantillons dans deux hydrolats différents: l'eau de fleur d'oranger en milieu de phase exponentielle et en phase stationnaire (échantillon #8.2), et l'eau de rose de mai en phase de latence et en phase stationnaire (échantillon #18.2). Nous avons lyophilisé 8 tubes de chaque condition contenant chacun 10 mL d'échantillon, dans des tubes Falcon de capacité 15 mL. Nous avons donc 16 échantillons par hydrolat. La méthode d'extraction et de dérivation a été inspirée de la méthode décrite par Wagner *et al.* et Dunn *et al.* (Wagner, Sefkow *et al.* 2003; Dunn, Broadhurst *et al.* 2011). Le lyophilisat a été repris dans 200µL de mélange de MeOH/H₂O dans les proportions 80/20, additionnés de 10µL d'acide succinique deutéré (étalon interne) (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, Etats-Unis) concentré à 100 µg/mL dans du MeOH (soit 1µg). Nous avons donc un volume total de 210 µL par échantillon. La même chose a été faite sans échantillon, afin d'obtenir un blanc réactif. Un volume *x* a été prélevé dans tous les tubes d'échantillons pour former un microtube moyen appelé « pool ». Le volume prélevé dans chaque échantillon pour former ce pool est défini comme suit :

$$\frac{\text{nombre total d'échantillons à rassembler} \times x}{\text{nombre de "pools" souhaités}} = \text{volume total} - x$$

$$x = \frac{\text{volume total} \times \text{nombre de "pools" souhaités}}{(\text{nombre total d'échantillons à rassembler} + \text{nombre de "pools" souhaités})} [\mu\text{L}]$$

Nous avons 16 échantillons par hydrolat, avec un volume total de 210 μL par échantillon, et nous souhaitons avoir 4 pools par hydrolat, donc dans cette expérience :

$$x = \frac{210 \times 4}{(16 + 4)} = 42 \mu\text{L}$$

Dans notre cas, nous avons donc prélevé 42 μL de chaque échantillon que nous avons déposé dans un tube eppendorf de capacité 1.5mL rassemblant toutes les fractions. Le tube a été vortexé et 3 x 168 μL ont été prélevés et versés dans 3 autres tubes. L'intégralité de chaque tube Falcon contenant les échantillons a été déposée dans des microtubes à bouchon vissé de capacité 1.5mL. Les microtubes ont été complètement séchés au bain sec à 80°C (Lab-line, Maharashtra, Inde). Le résidu sec a ensuite été additionné de 50 μL de methoxyamine (Supelco), concentrée à 20 mg/mL dans la pyridine (Sigma Aldrich), et a été chauffé pendant 15 min à 80°C. Un volume de 50 μL de MSTFA (réactif de dérivatisation) (Sigma Aldrich) a ensuite été additionné puis chauffé 15 minutes à 80°C. Enfin, un volume de 10 μL d'une solution d'alcane, contenant un mélange de n-dodecane (RI 1200), n-pentadecane (RI 1500), n-nonadecane (RI 1900), n-docosane (RI 2200), n-octacosane (RI 2800), n-dotriacontane (RI 3200) (tous Sigma Aldrich), a été ajouté dans tous les microtubes et le tout a été transféré dans un vial avec insert en vue de la GC-MS sur colonne apolaire.

Les échantillons ont été analysés par Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GCMS-QP 2010; Shimadzu, Kyoto, Japon). Les échantillons ont été injectés par un injecteur automatique (AOC-5000; Shimadzu), en mode splitless, à 250°C. La purge a été ouverte après 0,5 minutes. Les composés ont été séparés par une colonne capillaire apolaire db-5 (30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm) (Agilent technologies, Santa Clara, Etats-Unis). Le gaz vecteur utilisé a été l'hélium, à une vitesse constante de 35 cm/s. La programmation de température du four a été la suivante : température initiale de 70°C, maintenue pendant 2 minutes, puis 10°C par min jusqu'à 300°C, et enfin 5 minutes à 300°C (hold time). La détection a été effectuée par un spectromètre de masse à impact électronique à 70 eV, pour des masses (m/z) comprises entre 70 et 700, à une vitesse de 4 scans/s. La température de la source ionique était de 200°C et celle de la ligne de transfert était de 250°C.

L'identification des composés a été effectuée par comparaison des spectres de masse obtenus avec les spectres de masse des banques de données Wiley Mass Spectral library (8th edition), et NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 08). L'identification a été confirmée par la détermination des indices de rétention expérimentaux (RI) des composés, à l'aide de

la solution de n-alcanes ajoutée dans chaque échantillon, puis comparés aux valeurs données par la littérature (www.pherobase.com, www.flavornet.org, et webbook.nist.gov).

4.3.1.7. Analyse de l'espace de tête (Head space)

L'espace de tête a été analysé après incubation à 45°C pendant 15 minutes d'un volume de 4 mL d'hydrolat sous agitation 200 rpm. Un volume 10 µL de l'espace de tête a ensuite été prélevé et injecté en GC-MS (GCMS-QP 2010; Shimadzu) par un injecteur automatique (AOC-5000; Shimadzu), en mode splitless, à 250°C. La purge a été ouverte après 0,5 minutes. Les composés ont été séparés par une colonne capillaire UBWAX (30 m × 0.25 mm, 0.5 µm) (Interchim, Montluçon, France). Le gaz vecteur utilisé a été l'hélium, à une vitesse constante de 35,5 cm/s. La programmation de température du four a été la suivante : température initiale de 40°C, constante pendant 10 minutes, puis 10°C par min jusqu'à 230°C, et enfin 5 minutes à 230°C (hold time). La détection a été effectuée par un spectromètre de masse à impact électronique à 70 eV, pour des masses (m/z) comprises entre 29 et 450, à une vitesse de 1,7 scans/s. La température de la source ionique était de 200°C et celle de la ligne de transfert était de 250°C.

4.3.2. Analyses microbiologiques

4.3.2.1. Dénombrement de la microflore présente sur les fleurs fraîches de rose

Dans un premier temps, nous avons analysé la population microbienne présente sur des roses fraîches destinées à la distillation (*Rosa centifolia*) (pour la production de l'échantillon #17). Pour cela, nous avons récupéré des fleurs dans un sac stérile que nous avons fermé hermétiquement. Environ 4 heures plus tard, nous avons échantillonné 3 réplicats de 15 g de fleurs que nous avons chacun mélangé à 100 mL d'eau stérile déminéralisée, en utilisant un Stomacher® 400 (Seward, Worthing, UK) (2 x 60 s). Ensuite, un volume de 100 µL de la dilution décimale appropriée (dilution dans l'eau stérile déminéralisée) a été versé sur du milieu gélosé Plate Count Agar (PCA) (Biokar Diagnostics), et Yeast Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) (Biokar Diagnostics) afin d'énumérer respectivement les bactéries aérobies mésophiles, et les levures et moisissures. Le dénombrement a été effectué après 24h et 48h d'incubation à 30°C.

4.3.2.2. Recherche des conditions de culture adaptées aux bactéries présentes dans les hydrolats

Nous savons qu'il existe, et principalement dans les milieux aqueux oligotrophes, des microorganismes sous forme viable mais non cultivable en milieu de culture gélosé. Afin de définir au mieux la population microbienne des hydrolats, il a tout d'abord fallu déterminer les meilleures conditions de culture sur milieu gélosé, permettant la croissance d'un maximum de microorganismes. Pour cela, nous avons prélevé différents volumes de 4 hydrolats : deux eaux de rose (une eau de rose de mai *Rosa centifolia*, et une eau de rose bulgare *Rosa damascena*); et de deux eaux de fleur d'oranger (*Citrus aurantium L. ssp. amara L.*), issus d'échantillons produits en 2012. Nous avons ensuite étalé les dilutions (ou filtrations) adéquates sur milieu gélosé PCA dilué ou non d'un facteur 10 (PCA10), à pH=7 ou ajusté à pH=4 à l'aide de HCl (1M) et à différentes températures d'incubation (4, 15, 20, 30, et 37°C). Les boîtes de Petri ont été dénombrées régulièrement jusqu'à une période d'incubation de 7 jours.

4.3.2.3. Dénombrement microbiologique et évolution de la population

Les résultats obtenus lors de la mise au point des meilleures conditions de culture nous ont emmené à cultiver les bactéries aérobies mésophiles sur le milieu de culture PCA10 ; avec une température d'incubation de 30°C pendant 2 jours et vérification de l'absence d'apparition d'autres colonies jusqu'à 7 jours d'incubation. Le dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC) des bactéries aérobies mésophiles présentes dans les hydrolats a été effectué en étalant 100 µL de la dilution décimale appropriée (dilution dans l'eau déminéralisée stérile) sur le milieu gélosé PCA10. De même, 100 µL d'hydrolat ont été étalés sur milieu de culture YGC afin de vérifier la présence de levures ou de moisissures. Les colonies formées ont été dénombrées après 48h d'incubation à 30°C, puis laissées à incuber pendant une période de 7 jours.

La concentration totale en cellules bactériennes en suspension dans les hydrolats (cell/mL) a été mesurée par comptage en cellule de Malassez, à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Olympus BX50) sous un agrandissement x400.

4.3.2.4. Isolement et identification des bactéries

Les bactéries identifiées ont toutes été isolées des hydrolats après culture sur milieu gélosé PCA10 tel que décrit au paragraphe précédent. Approximativement 3 à 4 colonies par

hydrolats ont été sélectionnées pour leurs différences morphologiques, et observées par microscopie à contraste de phase sous agrandissement X1000. Toutes les colonies observées dans les hydrolats étaient composées de bactéries. Les bactéries isolées ont ensuite été cultivées 3 fois consécutives sur PCA10 par stries d'épuisement afin d'obtenir des cultures pures. Les cultures pures ont ensuite été prélevées à l'aide d'une oese et stockées à -80°C dans un microtube à bouchon vissé contenant une solution de 400 mL/L de glycérol (Sigma Aldrich).

Un total de 71 bactéries ont été ainsi isolées des hydrolats de rose et de fleur d'oranger. Ces bactéries ont tout d'abord été analysées par séquençage partiel du gène *rrs* (16s ARNr). Les isolats possédant une même séquence partielle de gène *rrs* ont été typés par une méthode de typage moléculaire (M13-PCR) afin de déterminer les clones parmi les isolats. Une seule souche représentative de chaque clone a été sélectionnée. Enfin, afin de différencier les espèces appartenant au même genre et dont le gène *rrs* n'est pas suffisamment discriminant, nous avons effectué une caractérisation phénotypique. La procédure est détaillée ci-dessous.

Extraction d'ADN

Afin de conserver au mieux l'ADN pendant l'extraction, tous les tubes ont été conservés dans la glace tout au long de l'expérimentation. L'équivalent d'une oese de colonies purifiées a été mis en suspension dans 400µL d'eau ultrapure stérile (Thermo Fisher, Waltham, Etats-Unis) dans un microtube à bouchon vissé. Les cellules bactériennes ont ensuite été broyées à l'aide de microbilles de silice (0,1 µm) dans un FastPrep (FP120A-230 ; Thermo electron corp, Waltham, Etats-Unis) à puissance maximale pendant 3x30 secondes. Le broyat a ensuite été additionné de 25 µL de sodium dodecyl sulfate (200 g/L), 100µL de NaClO₄ (5 mol/L) et 600 µL de chloroforme pur (tous Sigma-Aldrich). Après centrifugation (17000 x *g* pendant 3 minutes), la phase aqueuse a été séparée dans un nouveau tube de capacité 2 mL, et additionnée d'un volume de 1 mL d'éthanol absolu glacé (-20°C) (Sigma-Aldrich). L'éthanol permet la précipitation de l'ADN. Celui-ci a ensuite été récupéré à l'aide d'une pipette pasteur en verre dont on a préalablement brûlé l'extrémité afin de former un U, puis lavé par immersion dans un microtube d'éthanol à 70% (Sigma-Aldrich). L'ADN précipité sur la pipette pasteur a ensuite été séché à l'air libre sous une sorbonne, et solubilisé dans 100 µL d'eau ultrapure stérile (Thermo Fisher). Enfin, une solution de RNase de concentration 0.5 mg/mL (Roche Diagnostic, Mannheim, Allemagne) a été additionnée à l'échantillon puis le tout a été chauffé à 65°C pendant 15 minutes. L'ADN ainsi extrait a été conservé à -20°C.

Le gène *rrs* des isolats, correspondant aux positions 9 à 1548 du gène *rrs* de *B. subtilis* a été amplifié par PCR, en utilisant deux primers modifiés (FD1 MOD : AGA-GTT-TGA-TC(A,C)-TGG-CTC-AG et RD1 MOD : GG(A,C)-TAC-CTT-GTT-ACG-A(T,C)T-TC) comme déjà décrit par Guinebretière *et al.* (Guinebretière, Berge *et al.* 2001), avec des modifications mineures telles que le nombre de cycles (n=35) et l'utilisation d'un thermocycleur PCR 9700 (Life technologies, Carlsbad, Etats-Unis). L'amplification a été vérifiée sur gel d'agarose. Pour cela, un volume de 5 µL de produit de PCR additionné de 1 µL de tampon de charge 6x a été déposé dans les puits d'un gel d'électrophorèse, composé d'agarose (Lonza Seakem® LE, Bâle, Suisse) concentrée à 10 g/L dans 100 mL de tampon Tris-acetate-EDTA (TAE) (0,5x) (Serva, Heidelberg, Allemagne), dans lequel on a additionné 20 µL de bromure d'éthidium (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France). La migration a été effectuée dans une cuve d'électrophorèse, pendant environ 30 minutes, à 100 V, dans du tampon d'électrophorèse TAE (0,5x). Une bonne amplification est obtenue lorsque l'on obtient une seule bande de la taille souhaitée (environ 1500 pb).

Les produits de PCR ont été séquencés par GATC Biotech® (Constance, Allemagne), dans un séquenceur Sanger ABI 3730xl. Le séquençage partiel du gène *rrs* a été effectué à l'aide du primer S6 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3') correspondant à la position 518-534 du gène *rrs* de *Escherichia coli*.

L'identification des bactéries a été effectuée par comparaison du résultat de séquençage du gène *rrs* partiel avec les séquences des gènes *rrs* de souches types sur des banques de données telles que NCBI nucleotide blast et Ribosomal Database Project.

Les clones parmi les isolats ont été identifiés par typage moléculaire (M13-PCR), tel que décrit par Guinebretière *et al.* (Guinebretière and Nguyen-The 2003). Les fragments ont ensuite été révélés par électrophorèse sur un gel d'agarose (Lonza Seakem® LE, Bâle, Suisse) de concentration 15 g/L préparé dans un volume de 100 mL de tampon d'électrophorèse TAE (0,5x) (Serva, Heidelberg, Allemagne), additionné de 20 µL de bromure d'éthidium. La taille des fragments a été mesurée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgique). Les isolats provenant d'un même échantillon montrant un électrophorégramme identique ont été décrits comme étant des clones, une seule souche représentative parmi les clones a été retenue.

Parmi les bactéries isolées, de nombreuses espèces de *Burkholderia* sp. et de *Pseudomonas* sp. possèdent un gène *rrs* identique. Dans ce cas-là, le séquençage seul du gène *rrs* n'a pas permis de déterminer l'espèce à laquelle elles appartiennent, et une caractérisation phénotypique a dû être effectuée. C'était ainsi le cas de 15 souches

appartenant au genre *Burkholderia*, dont l'identification n'a pas permis de différencier *Bu. lata*, *Bu. cepacia*, et *Bu. Vietnamiensis* ; de même *Bu. lata* et *Bu. ambifaria*; ainsi que *Bu. lata*, *Bu. cepacia* et *Bu. multivorans*. C'est également le cas de 18 souches appartenant au genre *Pseudomonas*, dont l'identification n'a pas permis de différencier *P. migulae* et *P. panacis*, ou encore *P. veronii* et *P. extremorientalis*. Pour cette identification, nous avons utilisé des colonies pures que nous avons cultivées sur milieu de culture PCA10. Les espèces du genre *Burkholderia* ont pu être différenciées par leur différentes capacités à se multiplier à 42°C, leur activité gélatinase, β -galactosidase, et hémolytique, ainsi que leur capacité à réduire le NO₂ (Vanlaere, Baldwin *et al.* 2009). Les espèces du genre *Pseudomonas* peuvent être différenciées par leur activité gélatinase et hémolytique (Tableau 9) (Ivanova, Gorshkova *et al.* 2002; Park, Lee *et al.* 2005). La capacité de réduction du NO₂, l'activité β -galactosidase, et le métabolisme du glucose ont été testés sur galeries API 20 E® (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), en utilisant du NaCl (VWR) 8,5 g/L comme milieu de culture liquide, tel que décrit dans le protocole fourni. L'activité gélatinase a été testée sur milieu de culture solide composé de 40,0 g/L de gélatine (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), et une concentration plus élevée en extrait autolytique de levure (3,0 g/L) et de peptone (5,0 g/L) (Sigma-Aldrich) en boîtes de Petri tel que décrit par Smith *et al.* (Smith and Goodner 1958). L'activité hémolytique a été testée sur milieu de culture gélosé au sang de cheval « Horse blood agar » (BD Columbia, Le Pont de Claix, France), Incubé à 30°C pendant 48h. Le control positif a été vérifié par la présence du halo formé lors de la croissance de *Bacillus cereus* ATCC 14579. La capacité de croissance des bactéries à 42°C a été mesurée par l'apparition de colonies visibles sur milieu de culture gélosé PCA10, incubé pendant une période maximale de 7 jours.

Tableau 9 Caractéristiques biochimiques qui différencient *Pseudomonas migulae* et *P. panacis* ; *P. veronii* et *P. extremorientalis* ; *Burkholderia lata*, *B. cepacia* et *B. vietnamiensis* ; *B. lata* et *B. ambifaria* ; *B. lata* et *B. cepacia* ; *B. lata*, *B. cepacia*, et *B. multivorans* (Vanlaere, Baldwin *et al.* 2009) (Ivanova, Gorshkova *et al.* 2002; Park, Lee *et al.* 2005)

Souche bactérienne	Gélatinase	Hémolyse	Croissance à 42°C	beta galactosidase	Réduction du NO ₂
<i>Pseudomonas Migulae</i>	-	-			+
<i>P. Panacis</i>	+				
<i>P. veronii</i>	10-90%	-			+
<i>P. extremorientalis</i>	-	+			+
<i>Burkholderia lata</i>	+	-	-	-	souche dépendant
<i>B. cepacia</i>	(-)10-90%	-	(-)10-90%	+	-
<i>B. vietnamiensis</i>	-	(-)10-90%	+	+	+
<i>B. ambifaria</i>	+	(+)10-90%	(+)10-90%	+	+
<i>B. multivorans</i>	-	-	+	+	+

10-90% : entre 10 et 90% des souches présentent, on non, l'activité enzymatique ou la capacité de croissance.

Etude phylogénétique du microbiote

Les alignements multiples des séquences partielles du gène *rrs* ont été construits à l'aide du programme MUSCLE v3.8.31 (Edgar 2004) avec l'option "no-gap". La phylogénie a été reconstruite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance, implémentée dans le programme PhyML (v3.1/3.0 aLRT) (Guindon, Dufayard *et al.* 2010). La recherche de la vraisemblance des données a été effectuée sous différentes hypothèses du modèle évolutif GTR (generalised time reversible), depuis un arbre obtenu par l'algorithme de « neighbor-joining modifié » BIONJ (Gascuel 1997). La robustesse des branches a été mesurée à l'aide du test aLRT (approximate likelihood ratio test) SH-like (Anisimova, Gil *et al.* 2011).

L'analyse globale a été effectuée sur le site www.phylogeny.fr. La représentation graphique de l'arbre phylogénétique a été obtenue à l'aide du logiciel NJPlot (Perrière and Gouy 1996).

4.3.2.5. Evolution du profil volatil des hydrolats contaminés par certaines bactéries

Parmi les hydrolats analysés, l'échantillon ayant montré la plus grande variabilité dans son profil aromatique est l'échantillon #8.2, stocké à température ambiante. Les deux bactéries majoritaires de cet hydrolat ont été identifiées comme étant *Novosphingobium capsulatum* (IA_FO_33), et *Burkholderia vietnamiensis* (IA_FO_28). Ces deux souches pures ont tout d'abord été cultivées sur du milieu gélosé PCA10, à 30°C pendant une période de 48h. Puis dans 5 mL de milieu liquide PCB100 à 30°C durant la nuit, sous agitation 200 rpm. Ensuite, les précultures des souches pures ont été centrifugées à 2000 x *g* pendant 4 minutes, et le surnageant a été éliminé et remplacé par 5 mL d'eau stérile déminéralisée. La concentration bactérienne a été évaluée par microscopie optique à contraste de phase à l'aide d'une cellule de Malassez au grossissement x400, puis la population bactérienne a été ajustée à environ 5 log₁₀ UFC/mL dans de l'eau stérile déminéralisée. La concentration bactérienne exacte de cette suspension a été déterminée par étalement de la dilution appropriée sur milieu gélosé PCA10. Un volume de 50 µL de suspension bactérienne a ensuite été inoculé dans 4,95 mL d'hydrolat stérile préalablement filtré sur filtre de porosité 0,22 µm, pour obtenir une concentration finale de 3 log₁₀ UFC/mL dans un volume total de 5 mL. Les hydrolats utilisés pour cette expérience étaient les échantillons #8.1 et #17, respectivement eau de rose (*Rosa centifolia*) et eau de fleur d'oranger, filtrés à 0,22 µm dès leur réception au laboratoire et conservés à -20°C dans des bouteilles stériles jusqu'à utilisation. L'eau de fleur d'oranger utilisée pour cette expérience a été supplémentée de 20 µL de résidus bactériens autoclavés (20 min à 121°C), lavés et remis en suspension dans de l'eau déminéralisée stérile. Ces résidus bactériens provenaient de 100 mL de l'eau de fleur

d'oranger contaminée #8.2 (d'où proviennent les bactéries testées), afin de permettre la croissance de *Novosphingobium capsulatum* (IA_FO_33), incapable de se multiplier dans l'eau de fleur d'oranger stérile. L'expérience a été réalisée en triplicats. La concentration en composés volatils a été déterminée selon la méthode décrite au paragraphe 4.3.1.1, après 10 jours d'incubation à 30°C, sous agitation 200 rpm.

4.3.3. Analyse statistique

La significativité des différences entre les distributions statistiques de deux échantillons a été évaluée par un test de Mann-Whitney, effectué sur le logiciel XLstat (Addinsoft, Paris, France).

4.4. Stabilisation des hydrolats

4.4.1. Comportement de microorganismes pathogènes et d'altération dans les hydrolats

4.4.1.1. Souches bactériennes utilisées

Nous avons testé le comportement de 21 souches de bactéries pathogènes et d'altération, 1 souche de levure et 1 moisissure. Il s'agissait tout d'abord des deux espèces pour lesquelles l'absence dans 1 mL d'hydrolat est requise par la pharmacopée européenne (ANSM 2012), soit *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France) et *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, CIP 76.110, CIP 82.118, CIP 100720T, et CIP 107832 ; ensuite, nous avons testé le comportement d'autres souches pathogènes contrôlées en industrie agroalimentaire et cosmétique telles que *Escherichia coli* CIP 54.127, *Listeria monocytogenes* CIP 104794, *Salmonella Typhimurium* CIP 104115, et *Bacillus cereus* ATCC 14579 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) ; des bactéries pathogènes pour les plantes et d'altération telles que *P. protegens* DSM 19095 (Deutsche Sammlung für Mikororganismen and Zellkulturen , Braunschweig, Germany), *Burkholderia lata* DSM 23089, et *P. syringae* INRA CC1544 (Institut National de la Recherche Agronomique, Avignon, France) choisies pour leurs similitudes avec les souches isolées d'hydrolats ; enfin, des souches bactériennes d'altération isolées des eaux de fleur d'oranger et des eaux de rose contaminées telles que *P. protegens* IA_RC_09; *P. veronii* IA_RC_05; *P. panacis* IA_RC_13 ; *Bu. ambifaria* IA_FO_08; *Bu. lata* IA_RC_17 et IA_FO_15, *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09, et *Novoshingobium capsulatum* IA_FO_33 ; la levure *Candida albicans* ATCC 10231 ; et la moisissure *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (anciennement appelée *A. niger* ATCC 16404).

4.4.1.2. Hydrolats utilisés

Un échantillon d'eau de fleur d'oranger (#8.1) (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.) et un échantillon d'eau de rose de mai (#17) (*Rosa centifolia* L.), ont été récupérés rapidement en fin de distillation, filtrés à 0,22 µm dès leur réception au laboratoire (respectivement 10 jours et 1 jour après la distillation), puis stockés à -20°C dans un emballage stérile jusqu'à leur utilisation. Leurs populations microbiennes avant filtration étaient de 4,4 log₁₀ UFC/mL dans le cas de l'eau de fleur d'oranger (population à la réception de l'hydrolat au laboratoire en milieu de phase exponentielle), et inférieure au seuil de détection (<0,38 log₁₀ UFC/mL) dans le cas de l'eau de rose de mai. La concentration et la composition en composés volatils a été mesurée tel que décrit dans le paragraphe 4.3.1.1.

4.4.1.3. Inoculation de microorganismes pathogènes et d'altération dans les hydrolats

Toutes les 23 souches décrites au paragraphe 4.4.1.1 ont été inoculées dans les échantillons d'eau de fleur d'oranger et d'eau de rose de mai. Chaque souche a été précultivée sur du milieu gélosé PCA10, incubé à 30°C pendant 48h. Une colonie a ensuite été prélevée et une seconde préculture a été effectuée pendant la nuit, à 30°C sous agitation 200 rpm, dans 5mL de milieu de culture liquide PCB100 pour une meilleure adaptation des bactéries aux conditions oligotrophes des hydrolats. La suspension bactérienne a ensuite été centrifugée à 2000 x g pendant 4 minutes à 4°C et le surnageant a été éliminé et remplacé par 5 mL d'eau déminéralisée stérile. La population bactérienne de chaque souche a été évaluée à l'aide d'une cellule de Malassez, avec un microscope à contraste de phase (Olympus BX50), et un grossissement x400. La suspension a ensuite été diluée pour obtenir une concentration bactérienne de 5,0 log₁₀ UFC/mL. Cette population a été mesurée exactement par étalement de 100 µL de la dilution appropriée sur milieu gélosé PCA10. Puis un volume de 50 µL de la suspension bactérienne a été versé dans 4,95 mL d'hydrolat afin d'obtenir une population de 3,0 log₁₀ UFC/mL. Les hydrolats inoculés avec les différentes souches ainsi que les contrôles stériles ont été incubés à 30°C sous agitation 200 rpm pendant une période minimale de 144h. Les expériences ont été effectuées en triplicats de différentes précultures et cultures, pour chaque combinaison souche/hydrolat. Les populations bactériennes ont ensuite été évaluées par étalement de 100 µL de la dilution appropriée, sur milieu gélosé PCA10 dans le cas des bactéries, levures et moisissures, et YGC également dans le cas des levures et moisissures (*C. albicans* et *A. brasiliensis*). Les colonies formées ont été dénombrées après 48h d'incubation à 30°C.

4.4.2. Comportement des souches bactériennes isolées des hydrolats sous différentes conditions de pH et de température

Nous avons utilisé sept souches préalablement isolées des hydrolats (*P. protegens* IA_RC_09, *P. veronii* IA_RC_05, *P. panacis* IA_RC_05, *Bu. ambifaria* IA_FO_08, *Bu. lata* IA_RC_17, et IA_FO_15, et *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09), purifiées et conservées dans le glycérol tel que décrit dans le paragraphe 4.3.2.4. Toutes les souches pures ont été cultivées sur milieu de culture gélosé PCA10 pendant 48h à 30°C. Une colonie isolée de chaque culture a ensuite été prélevée à l'aide d'une oese et mise en suspension dans 5 mL de milieu de culture liquide. Nous avons utilisé du milieu liquide PCB10 pour les tests de croissance à différents pHs, et du milieu de culture PCB300 pour les tests de viabilité à différentes températures. Ces précultures ont été laissées à incuber pendant une nuit à 30°C sous agitation 200 rpm. Les suspensions bactériennes ont ensuite été centrifugées et le surnageant a été éliminé. Les culots bactériens ont ensuite été remis en suspension dans un volume de 5 mL d'eau déminéralisée stérile pour les tests de croissance à différents pH, et dans 5 mL de milieu de culture PCB300 pour les tests de viabilité à différentes températures. Leur concentration bactérienne a été évaluée à l'aide d'une cellule de Malassez, par microscopie à contraste de phase, au grossissement x 400. Toutes les suspensions bactériennes ont ensuite été ajustées à environ 5 log₁₀ UFC/mL.

Pour les tests de capacité de croissance à différents pH, du milieu de culture PCB10 a été préalablement ajusté à pH=3,5 ; 4,0 ; 4,5; et 5,0 à l'aide d'une solution de HCl (1M), puis stérilisé par filtration (0,22 µm). Un volume de 4,95 mL de chaque solution a ensuite été versé dans un tube en verre à bouchon vissé stérile de capacité 10 mL. Un volume de 50 µL de suspension bactérienne a ensuite été inoculé dans un tube de chaque pH. Les tubes ont ensuite été incubés à 30°C pendant une période de 12 jours sous agitation 200 rpm. La population initiale a été contrôlée par étalement de 100 µL de la dilution décimale appropriée sur du milieu de culture gélosé PCA10 et incubation à 30°C pendant 48h. L'absorbance à 600 nm (A₆₀₀) de chaque tube a été mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible (Helios Epsilon, Thermo electron corporation, Madison, Etats-Unis). Une croissance positive a été évaluée pour une augmentation de l'absorbance à 600 nm supérieure à 0.01 à la fin de la période d'incubation.

Pour les tests de viabilité à 5°C et à 30°C, un volume de 50 µL de suspension bactérienne a été versé dans deux tubes en verre à bouchon vissés stériles de capacité 10 mL contenant un volume de 4,95 mL de milieu de culture PCB300 stérile, puis un des deux tubes a été incubé en chambre froide à 5°C et le deuxième tube a été incubé à 30°C, sous agitation 200 rpm pendant une période de 12 jours. La viabilité des microorganismes a ensuite été évaluée par

prélèvement et étalement de 100 µL de la dilution décimale appropriée sur milieu de culture gélosé PCA10, puis incubé à 30°C pendant 48h.

Toutes ces expériences ont été effectuées en triplicats, avec différents inoculum.

4.4.3. Effet de différents conservateurs sur les microorganismes capables de se multiplier dans les hydrolats.

4.4.3.1. Sélection des conservateurs

Pour cette expérience, 21 conservateurs ont été sélectionnés pour leur conformité avec les réglementations européennes relatives aux produits cosmétiques et/ou agroalimentaires (respectivement (CE) 1223_2009 et (UE) 1129/2011). Leur limpidité, leur couleur mais également leur odeur après addition dans les hydrolats ont également été pris en compte (tableau 17). Les cosmétiques autorisés pour leur utilisation dans les produits cosmétiques sont le 2-phenoxyethanol (>99%) (Thor Personal Care, Compiègne, France), le Microcare[®] IT/ITO (composé de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one 1,125%, 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one 0,375% et de sels de Mg 23,0%) (Thor Personal Care, Compiègne, France), l'Elestab[®] FL15 (composé de chlorphénésine et de méthylparabène (5 à 10% chacun)) (Laboratoires Sérobiologiques, Pulnoy, France), le Cosgard (composé d'alcool benzylique, d'acide déhydroacétique et d'eau) (Aromazone, Paris, France), de l'alcool benzylique pur (>99%) (Sigma-Aldrich), et de l'extrait de pépin de pamplemousse liquide (EPP, composé d'extrait de pépin de pamplemousse fermenté additionné d'acide citrique, lactique, et ascorbique) (Aromazone, Paris, France) (tableau 18). Les acides organiques testés (n = 7) étaient le sorbate de potassium (>99.8%) (Brenntag, Chassieu, France), le benzoate de sodium (Brenntag, Chassieu, France), l'acide DL-malique (>99%), l'acide *trans*-férulique (>99%), l'acide citrique (>99,5%), l'acide DL-lactique (>85%), et le déhydroacétate de sodium (>98,0%) (tous provenant de Sigma-Aldrich). Les extraits de plantes testés (n = 5) étaient sous forme de poudre et provenaient tous de Naturex (Avignon, France). Il s'agissait des poudres de ginseng (*Panax ginseng*) ; de deux extraits de thé vert (*Camellia sinensis* L.), l'un contenant 50% de polyphénols, et l'autre 90% de polyphénols ; d'extrait de pépin de pamplemousse (*Citrus x paradisi* Macfad) (contenant 50% de flavonoïdes) ; et d'extrait de pépin de raisin (*Vitis vinifera* L.) (contenant 50% de polyphénols). Nous avons également testé un extrait de romarin désaromatisé (Stabilenhance[®], Naturex). Enfin nous avons testé un peptide antimicrobien, la nisine (Sigma-Aldrich), et l'éthanol absolu (>99,8%) (Sigma-Aldrich). Les concentrations maximales testées étaient en accord avec les concentrations maximales recommandées par les réglementations, et/ou la solubilité dans l'eau, et/ou la

limpidité, et/ou l'odeur (tableau 17). L'effet d'un mélange de benzoate de sodium et de sorbate de potassium a également été évalué par mélange équimolaire (1 :1 mol/mol) des formes non dissociées à pH=5 des deux composés. Tous les conservateurs ont été préparés environ 4h avant leur utilisation dans de l'eau ultrapure MilliQ plus™ (Merck Millipore, Billerica, Etats-Unis), deux fois plus concentrés que leur concentration finale souhaitée. Toutes les solutions d'acides organiques ainsi que le milieu de culture PCB5 utilisé avec ces acides ont été ajustés à pH=5 ± 0,04 par addition de solution de HCl (1M). Toutes les solutions de conservateurs ont ensuite été stérilisées par filtration à travers un filtre de porosité 0,22 µm et conservés à 5°C jusqu'à leur utilisation.

4.4.3.2. Effet des conservateurs testés sur les bactéries, en milieu de culture PCB10

L'effet des conservateurs, en milieu de culture PCB10 a été testé sur les souches bactériennes capables de se multiplier dans l'eau de rose de mai (#17) et l'eau de fleur d'oranger (#8.1) (tableau 11). Il s'agit des souches préalablement isolées des hydrolats (n = 7) : *P. protegens* IA_RC_09, *P. veronii* IA_RC_05, *P. panacis* IA_RC_13, *Bu. ambifaria* IA_FO_08; *Bu. lata* IA_RC_17 et IA_FO_15, et *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09 ; et des souches de *P. aeruginosa* (n = 4) CIP 76.110, CIP 82.118, CIP 100720T et CIP 107832. Chaque souche a été cultivée sur milieu gélosé PCA10, et incubée à 30°C pendant 48h. Une colonie a ensuite été prélevée à l'aide d'une oese stérile et mise en suspension dans 5mL de milieu de culture liquide PCB10, puis incubé à 30°C sous agitation 200 rpm pendant une nuit. Après incubation, la suspension bactérienne a été centrifugée à 2000 g, 4 minutes, à 4°C. Le surnageant a ensuite été éliminé, et le culot a été remis en suspension dans 5 mL de PCB5. Après homogénéisation, la concentration bactérienne a été évaluée par comptage en cellule de Malassez, à l'aide d'un microscope à contraste de phase sous grossissement x400, puis ajustée à 6,3 log₁₀ UFC/mL dans du milieu PCB5. Ce milieu avait préalablement été ajusté à pH=5 puis stérilisé par filtration à 0,22 µm lors des tests des différents acides organiques, tel que décrit au paragraphe précédent. Un volume de 125 µL de solution de conservateur a été versé dans les puits d'une microplaque 96 puits (Greiner Bio-one, Les Ulis, France), et mélangés à 125 µL de suspension bactérienne afin d'obtenir une concentration de 6.0 log₁₀ CFU/mL dans chaque puits. Cette concentration initiale a été évaluée par étalement de la dilution appropriée de suspension bactérienne sur milieu gélosé PCA10. Des puits contenant les solutions de conservateurs stériles additionnées de milieu PCB5 stérile ainsi que des puits contenant les suspensions bactériennes additionnées d'eau ultrapure (MilliQ plus™, Merck) stérile ont été utilisés comme contrôle sur chaque microplaque. Chaque microplaque a été incubée à 30°C pendant 48h sous agitation 200 rpm à l'aide d'un

spectrophotomètre (Tecan, Männedorf, Suisse). L'absorbance à 600 nm (A_{600}) a été mesurée toutes les 15 minutes. Une augmentation de l'absorbance (A_{600}) de 0.02 a été considérée comme une croissance positive.

4.4.3.3. Effet des conservateurs sur un mélange bactérien dans les hydrolats

Les conservateurs ayant montré une activité antimicrobienne en milieu de culture PCB10 ont été testés sur un mélange des 7 souches préalablement isolées d'hydrolats. Tout d'abord, chaque conservateur a été ajouté à la concentration désirée dans un volume de 40 mL de chaque hydrolat, puis stérilisé par filtration à 0,22 μm . Un volume de 4,95 mL de chaque solution a été versé dans des tubes en verre à bouchon vissé de capacité 10 mL stériles. Les souches utilisées sont *P. protegens* IA_RC_09, *P. veronii* IA_RC_05, *P. panacis* IA_RC_13, *Bu. ambifaria* IA_FO_08; *Bu. lata* IA_RC_17 et IA_FO_15, et *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09. Chaque souche bactérienne a été précultivée et cultivée tel que décrit au paragraphe 4.4.1.3. Les suspensions bactériennes, préalablement ajustées à 5 \log_{10} cellules/mL, ont été mélangées en versant un volume de 200 μL de chaque suspension bactérienne dans un microtube stérile de capacité 1,5 mL (StarLab, Hamburg, Germany). La population exacte de chaque suspension a été évaluée par étalement de la dilution appropriée sur milieu PCA10. Le microtube contenant toutes les suspensions bactériennes a ensuite été vortexé pendant environ 10 s, puis un volume de 50 μL a été déposé dans 4,95 mL d'hydrolat pour obtenir une concentration finale de 3.0 \log_{10} cellules/mL. Des tubes contenant les hydrolats sans conservateurs ont été utilisés comme contrôle. La concentration réelle initiale a été mesurée par étalement de la dilution appropriée de suspension bactérienne sur milieu gélosé PCA10, et incubation à 30°C pendant 48h. L'évolution de la population bactérienne a été mesurée par prélèvement de 200 μL de chaque échantillon et étalement de la dilution appropriée sur milieu gélosé PCA10 et incubation à 30°C pendant 48h.

Toutes les expériences ont été effectuées en triplicats, sur des inoculums différents.

5. Résultats

5.1. Les hydrolats, des produits sensibles aux contaminations microbiennes

5.1.1. Recherche de conditions de culture adaptées

Une observation microscopique des hydrolats avec dénombrement des germes en cellule de Malassez, nous a emmené à rechercher les milieux de culture les plus favorables à une reprise de croissance du plus grand nombre de microorganismes présents dans les hydrolats. Pour cela, nous avons testé différentes conditions de température, de pH, et de concentration en nutriments dans le milieu de culture gélosé, sur 4 échantillons d'eau florale produits en 2012 et conservés en bouteille de verre de 200 mL dans des conditions non stériles. Ainsi, nous pouvons remarquer (tableau 10) que le pH de culture permettant le recouvrement d'un maximum de bactéries est pH=7. Les températures les plus adaptées sont 20°C et 30°C. L'utilisation d'un milieu de culture dilué d'un facteur 10 permet le dénombrement d'un plus grand nombre de bactéries, notamment dans l'eau de fleur d'oranger. Enfin, la majorité des germes apparaît après 48h d'incubation, mais certaines colonies apparaissent après 5 à 7 jours de culture, en grand nombre. Tout le long de cette thèse, les colonies formées sur boîte de Petri ont donc été dénombrées après 48h d'incubation, et les boîtes ont été laissées à incuber jusqu'à 7 jours, puis l'apparition de colonies a été vérifiée.

Tableau 10 Dénombrement des bactéries aérobies de 4 échantillons d'hydrolats sous différentes conditions de pH, de température, et de dilution du milieu de culture PCA.

log ₁₀ UFC/mL								
Echantillons	PCA/pH4					PCA10/pH4		
	4 °C	15°C	20°C	30°C	37°C	15°C	20°C	
ERM	<0,5	NT	<0,5	NT	<0,5	<0,5	NT	
ERB	<0,5	NT	<0,5	NT	<0,5	<0,5	NT	
EFO 1	<0,5	NT	<0,5	NT	<0,5	<0,5	NT	
EFO 2	<0,5	6,4	6,4	4,4	<0,5	5,4	5,4	

log ₁₀ UFC/mL								
Echantillons	PCA/pH7					PCA10/pH7		
	4°C	15°C	20°C	30°C	37°C	15°C	20°C	
ERM	4,7	4,8	4,8	4,7	<0,5	4,5	4,8	
ERB	1,7	1,8	1,8	1,9	<0,5	1,2	1,3	
EFO 1	4,9	5,0	5,0	4,9	<0,5	4,7	4,7	
EFO 2	<0,5	<0,5	3,9	2,8	<0,5	5,8	5,6	

NT : Non testé ; ERM : eau de rose de mai ; ERB : eau de rose bulgare ; EFO : eau de fleur d'oranger.

Tout au long de cette étude, chaque dénombrement sur milieu gélosé a été comparé à un dénombrement des cellules par microscopie à contraste de phase en cellule de Malassez afin d'éviter une sous-estimation du nombre de germes. Le comptage en cellule de Malassez permet de dénombrer le nombre total de microorganismes présents dans l'échantillon, y compris les bactéries mortes et les bactéries viables mais non cultivables. Si le dénombrement en cellule de Malassez est supérieur au dénombrement sur boîte de Petri, nous pouvons être en présence de bactéries viables mais non cultivables, mais également de bactéries non viables. Les cas échéant, il a été nécessaire de vérifier la présence de cellules non viables dans l'échantillon par un test de viabilité par kit Live/Dead® BacLight (Molecular probes, Eugene, USA). Les résultats ont permis de mettre en évidence que la technique de dénombrement sur le milieu gélosé sélectionné permet de dénombrer tous les microorganismes présents dans l'échantillon (Labadie, Ginies *et al.* 2015).

5.1.2. Une microflore capable de se multiplier dans les hydrolats

5.1.2.1. Objectifs de l'étude

La pharmacopée impose une population en bactéries aérobies mésophiles maximale de $2 \log_{10}$ UFC/mL, la population en levures et moisissures totales ne doit pas dépasser $1 \log_{10}$ UFC/mL et les deux bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* doivent être absentes dans 1 mL d'hydrolat (ANSM 2012). De nombreux lots d'hydrolats, provenant de pays et de fournisseurs différents, n'ont pas été conformes aux critères microbiologiques souhaités. L'objectif de cette étude est donc de définir les causes et les conséquences d'altérations microbiologiques.

5.1.2.2. Stratégie

Les causes de telles altérations microbiologiques doivent être recherchées dans la nature des substrats permettant la croissance microbienne. Ces substrats peuvent être constitués des composés volatils présents dans les hydrolats, mais également de composés non-volatils tels que des acides aminés ou des sucres dont nous avons recherché la présence. Parallèlement, nous avons dénombré et identifié les microorganismes capables de se multiplier dans les hydrolats. Nous avons ensuite tenté d'appréhender l'impact de certains microorganismes sur les composés volatils des hydrolats.

Pour cela, nous avons analysé la composition chimique et microbiologique de 22 échantillons d'hydrolats provenant de différents fournisseurs autour du bassin

méditerranéen (Tableau 11) : 10 échantillons d'eau de fleur d'oranger (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.), 6 échantillons d'eau de rose Bulgare (*Rosa damascena* Miller), et 6 échantillons d'eau de rose de mai (*Rosa centifolia* L.).

5.1.2.3. Résultats et discussion

❖ La composition chimique des hydrolats

Analyse des composés volatils

Nous avons analysé les profils volatils de 22 échantillons d'eau florale. Dans le cas des eaux de fleur d'oranger, la concentration médiane en composés volatils était de 677 mg/L, et le composé majoritaire est le linalol, avec une proportion médiane de 44,1% (% aire des pics). Dans le cas des eaux de rose, *Rosa damascena* et *Rosa centifolia*, la concentration médiane en composés volatils était respectivement de 205 mg/L et 116 mg/L, et le composé majoritaire était le 2-phényéthanol dans les deux types d'eaux de rose avec une proportion médiane de respectivement 25 % et 46 %. De nombreux composés ont montré une grande variabilité dans leurs proportions. C'est par exemple le cas de la 6-méthyl-5-hepten-2-one dans l'eau de fleur d'oranger, dont les proportions minimales et maximales observées étaient de 0,01 % à 22,0 % ; ou encore du géraniol dans l'eau de rose bulgare dont les proportions ont varié de 0,6 % à 30,7 %. Ces profils variables correspondent aux profils déjà observés dans le cas d'eaux florales étudiés dans par d'autres auteurs ou des données industrielles (Agarwal, Gupta *et al.* 2005; Aslam Khan and Shoaib Ur 2005; Jeannot, Chahboun *et al.* 2005; Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009; Mahboubifar, Shahabipour *et al.* 2014 ; Albert veille données non publiées) (Tableau 12).

Les composés majoritaires observés dans ces hydrolats, sont connus pour présenter des propriétés antimicrobiennes contre de nombreuses bactéries pathogènes et d'altération (Cosentino, Tuberoso *et al.* 1999; Burt 2004; Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011; Zhu, Zhou *et al.* 2011). Leurs concentrations minimales inhibitrices sont proches de celles mesurées dans les hydrolats mais ne sont visiblement pas suffisantes pour éviter la multiplication bactérienne dans l'eau de rose par exemple (Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009), et dans les hydrolats analysés lors de cette étude.

Analyse des composés non-volatils et du pH.

Le pH des hydrolats est compris entre pH4 et pH7. Aucun lien n'a pu être fait entre le pH et le lieu ou l'année de production, ou encore le type d'eau florale (Tableau 13). Les hydrolats

n'ayant jamais été contaminés contiennent entre $0,21 \pm 0,01$ mg/L et $0,38 \pm 0,03$ mg/L de glucides. Leur teneur en matière sèche variait de 95 à 702 mg/L, à l'exception d'un échantillon distillé en laboratoire, contenant seulement 4,0 mg/L. La présence de composés non-volatils dans les hydrolats, bien que produits de distillation, suggère leur entraînement par effet de primage et de moussage lors de la distillation (Cosandey and von Rohr 2001; Prabhudharwadkar, More *et al.* 2010; Nakoryakov, Misyura *et al.* 2012). Cet effet a été confirmé lors d'essais de distillation de solution de composés non-volatils en laboratoire. Ainsi, le distillat contient des composés non-volatils, entraînés pendant la distillation et pouvant potentiellement être utilisés comme substrats de croissance par les microorganismes.

❖ La microflore des hydrolats

Les premières observations microscopiques et le dénombrement sur milieu gélosé des hydrolats non conformes ont montré la présence d'une flore bactérienne à des concentrations pouvant atteindre $7 \log_{10}$ UFC/mL. Nous nous sommes rapidement aperçu que la totalité des échantillons analysés, y compris ceux n'ayant pas été classés non conformes, présentaient une microflore bactérienne comprise entre 4 et $7 \log_{10}$ UFC/mL.

Nous avons émis deux hypothèses sur l'origine des contaminations. Soit la microflore provient de bactéries ayant survécu à la distillation et capables ensuite de se multiplier dans les hydrolats, soit la microflore provient d'une contamination exogène pendant le procédé de distillation ou le stockage.

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons tout d'abord dénombré la microflore présente sur les roses fraîchement cueillies. Nous avons ainsi constaté que la population microbienne est composée de $4,9 \log_{10}$ UFC/g ($\pm 0,3$) ($n=3$) (moyenne \pm écart-type) de bactéries et $3,9 \log_{10}$ UFC/g ($\pm 0,5$) de levures et moisissures. Soit une population minimale de $4,5 \log_{10}$ UFC/mL ($\pm 0,3$) et $3,5 \log_{10}$ UFC/mL ($\pm 0,5$) dans l'eau de la cuve de distillation. Nous avons ensuite prélevé de l'eau de rose de mai en fin de distillation et sur deux années consécutives. Nous avons ensuite suivi l'évolution de la microflore bactérienne pendant une période minimale de 3 mois. Nous avons ainsi pu remarquer que la population microbienne initiale était inférieure à la limite de détection, soit $<0,5 \log_{10}$ UFC/mL et qu'aucune contamination n'est survenue pendant les 3 mois de suivi. Le distillat est donc stérile en sortie d'essencier. Le procédé de distillation (production de vapeur d'eau à 100°C pendant une période d'environ 4h) entraîne donc une réduction de la population microbienne supérieure à $4,0 \log_{10}$ UFC/mL.

Quelques semaines après la distillation, en industrie, les eaux de rose de mai ont été filtrées sur une cartouche de porosité 0,22 µm puis stockées dans des cuves de stockage de capacité 1000 à 8000 L. Nous avons prélevé des échantillons d'eau de rose en sortie de filtration (#18.1 et #18.1 ; #22.1 et #22.2) (Figure 38, C et D), et nous avons également suivi l'évolution de la microflore par prélèvements réguliers sur une période minimale de 3 mois. La filtration a permis de réduire la population bactérienne à des niveaux proches de la limite de détection ($0,5 \log_{10}$ UFC/mL), mais nous avons ensuite pu observer une croissance bactérienne dans tous les échantillons ainsi filtrés, jusqu'à des niveaux de flore pouvant atteindre $7 \log_{10}$ UFC/mL, que les eaux florales soient stockées à température ambiante (environ 21°C), ou en chambre froide à 5°C. L'étape de filtration, effectuée en conditions propres mais non aseptiques, réduit donc la microflore mais ne l'élimine pas totalement. Celle-ci est ensuite capable de se multiplier. Nous avons fait de même avec deux échantillons d'eau de fleur d'oranger (#7.1, #7.2 ; et #8.1 et #8.2) (Figure 38, A et B). Nous avons pu remarquer une multiplication bactérienne jusqu'à environ $6 \log_{10}$ UFC/mL en 3 à 10 jours lors d'un stockage à température ambiante dans les deux échantillons (#7.2 et #8.2), et deux comportements différents lors d'un stockage à 5°C : une croissance à la population maximale (environ $6 \log_{10}$ UFC/mL) en 3 jours dans le premier échantillon (#7.1), et une décroissance progressive jusqu'à un niveau de flore indétectable ($<0,5 \log_{10}$ UFC/mL) dans le deuxième échantillon (#8.1). Un stockage au froid ne permet donc pas de contrôler la prolifération bactérienne dans tous les échantillons.

Tous les microorganismes isolés des hydrolats étaient composés de bactéries. Aucune levure ou moisissure n'a pu être détectée parmi les 22 échantillons analysés. L'identification de 58 bactéries isolées des hydrolats a montré qu'il s'agit de bactéries à Gram-négatif, dont 22 appartenaient au genre des *Pseudomonas*, 17 au genre des *Burkholderia*, ainsi que deux nouveaux genres bactériens présumés appartenant à l'ordre de Rhodospirillales, dont 8 bactéries possédant de même gène *rrs* appartenaient à la famille des *Rhodospirillaceae*, et 4 bactéries possédant le même gène *rrs* appartenaient à la famille des *Acetobacteraceae* ; enfin, 7 autres bactéries appartenant à diverses familles (Tableau 14 et Figure 40 « supplementary data »). La plupart des bactéries des genres *Pseudomonas* sp. et *Burkholderia* sp. sont oligotrophes, elles peuvent se multiplier dans des milieux minéraux simples, avec un seul composé organique comme source de carbone, et ne requièrent pas de facteur de croissance (vitamines, protéines, ou acides gras par exemple) (Elomari, Coroler *et al.* 1996; Palleroni 2005^a; Palleroni 2005^b; Vanlaere, Baldwin *et al.* 2009). La plupart d'entre elles sont décrites comme acido-tolérantes (Stopnisek, Bodenhausen *et al.* 2014). De même, les bactéries appartenant aux familles des *Acetobacteraceae* comprennent les bactéries acétiques, capables de se développer à des pH très bas, enfin la plupart des bactéries

appartenant à la famille des *Rhodospirillaceae* sont aérotolérantes, se développant majoritairement dans les eaux stagnantes, et capables de produire leur énergie par photosynthèse (Garrity, Brenner *et al.* 2001). Ces bactéries semblent donc bien adaptées aux conditions oligotrophes et parfois acides rencontrées dans les hydrolats. Aucun lien n'a pu être fait entre les espèces bactériennes et le lieu ou l'année de production, ou encore le type d'eau florale (tableau 14).

Plusieurs populations peuvent se succéder. Les premiers contaminants utilisent les substrats présents dans les hydrolats, et les populations suivantes utilisent les métabolites et les résidus bactériens des populations précédentes comme substrat de croissance. Cette utilisation de résidus bactériens comme substrat de croissance a été confirmée par la capacité de croissance de *Novosphingobium capsulatum* uniquement après addition de résidus bactériens stérilisés dans l'eau de fleur d'oranger.

❖ Impact de *Burkholderia vietnamiensis* et *Novosphingobium capsulatum* sur les composés volatils des hydrolats

De nombreux microorganismes sont capables de métaboliser les composés volatils tels que les terpènes (Vandenbergh 1989; Demyttenaere 2001; Wolken and van der Werf 2001; Förster-Fromme, Höschle *et al.* 2006; Lüddeke, Wülfing *et al.* 2012; Marmulla and Harder 2014). Parmi les bactéries isolées, *Burkholderia vietnamiensis* (IA_RC_09) et *Novosphingobium capsulatum* (IA_FO_33) ont été capables de convertir des composés volatils, tels que le géraniol pour produire l'acide gérannique ou la 6-méthyl-5-hepten-2-one ; ou encore le phényléthylacétate pour produire le 2-phényléthanol (figure 39).

5.1.2.4. Conclusion de l'étude

Les hydrolats de fleur d'oranger et de rose présentent un microbiote hétérogène capable de proliférer à des niveaux de population bactérienne relativement élevés, jusqu'à 6 à 7 UFC/mL, malgré la présence de composés volatils. Des traces de composés non-volatils sont entraînées par le procédé de distillation et pourraient être utilisées comme substrat de croissance par les microorganismes. Certaines souches présentes dans les hydrolats peuvent avoir un impact sur les composés volatils, et modifier ainsi les propriétés organoleptiques. La production de 6-méthyl-5-hepten-2-one (également appelée sulcatone), semble être spécifique de la présence de *N. capsulatum* et pourrait ainsi constituer un marqueur chimique d'une telle contamination. Toutes les bactéries présentes dans les hydrolats pourraient être éliminées par pasteurisation, mais celle-ci pourrait entraîner une

dégradation des composés volatils (Baydar, Kuleasan *et al.* 2013). De plus, une stabilisation physique, telle que la filtration, n'éliminerait pas la possibilité d'une contamination pendant les étapes ultérieures de stockage et d'échantillonnage. En l'absence de stockage et de manipulation des hydrolats en conditions aseptiques, et du fait de l'inefficacité d'un stockage au froid (5°C) à long terme, il est donc nécessaire de recourir à une stabilisation chimique adaptée au microbiote et permettant de conserver toutes les propriétés physiques et organoleptiques des hydrolats.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication présentée ci-après et publiée dans le journal « Food Research International » (Elsevier):

Labadie, C., *et al.*, *Hydrosols of orange blossom (Citrus aurantium), and rose flower (Rosa damascena and Rosa centifolia) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota*, **Food Research International** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.014>

Ainsi qu'un communiqué de presse sur le site inra.fr :

<http://presse.inra.fr/Ressources/Communiqués-de-presse/produits-aromatiques>

Title

Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota

Authors

Cécile LABADIE ^{a,b,c}, Christian GINIES ^{b,c}, Marie-Hélène GUINEBRETIERE ^{b,c}, Catherine M.G.C RENARD ^{b,c}, Céline CERUTTI ^a, Frédéric CARLIN ^{b,c*}

^a Albert Vieille SAS, 06227 Vallauris, France.

^b INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France.

^c Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France.

Full postal and E-mail addresses of authors

Cécile Labadie (cecile.labadie@avignon.inra.fr; ce.labadie@hotmail.com), Céline Cerutti (CCerutti@ALBERTVIEILLE.com).

Albert Vieille SAS, 629 route de Grasse, BP 217 06227, Vallauris, France

Christian Ginies (christian.ginies@avignon.inra.fr), Marie-Hélène Guinebretière (marie-helene.guinebretiere@avignon.inra.fr), Catherine Renard M.G.C (Catherine.Renard@avignon.inra.fr).

UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA Centre de Recherche PACA, 228, Route de l'Aérodrome, CS40509, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France

*Corresponding author

Frédéric CARLIN (frederic.carlin@avignon.inra.fr); tel : +33 4 32 72 25 19

UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA Centre de Recherche PACA, 228, Route de l'Aérodrome, CS40509, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France

Abstract

Hydrosols are hydrodistillation products of aromatic plants. They contain less than 1 g/L of dispersed essential oils giving the organoleptic properties. Hydrosols are subjected to microbial proliferation. Reasons for spoilage have to be found in the nature of substrates supporting growth and of microbiological contaminants. The composition in essential oils and the microbiota of 22 hydrosol samples of *Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L. (orange blossom), *Rosa damascena* Miller (rose D.), and *Rosa centifolia* L. (rose C.) flowers were analyzed to determine factors responsible for decay. The median concentrations in essential oils were 677 mg/L for orange blossom hydrosols, 205 mg/L for rose D. hydrosols, and 116 mg/L for rose C. hydrosols. The dry matter content of these hydrosols varied between 4.0 mg/L and 702 mg/L, and the carbohydrate content varied between 0.21 mg/L and 0.38 mg/L. These non-volatile compounds were likely carried over during distillation by a priming and foaming effect, and could be used as nutrients by microorganisms. A microbial proliferation at ambient temperature and also at 5°C has been observed in all studied hydrosols when stored in a non-sterile container. In contaminated hydrosols, maximal counts were about 7 log₁₀ CFU/mL, while the French pharmacopeia recommends a maximal total bacteria count of 2 log₁₀ CFU/mL. Neither yeast nor mold was detected. The isolated microbial population was composed of environmental Gram-negative bacteria, arranged in four major genera: *Pseudomonas* sp., *Burkholderia cepacia* complex, and presumably two new genera belonging to *Acetobacteraceae* and *Rhodospirillaceae*. Among those bacteria, *Burkholderia vietnamiensis* and *Novosphingobium capsulatum* were able to metabolize volatile compounds, such as geraniol to produce 6-methyl-5-hepten-2-one or geranic acid, or phenylethyl acetate to produce 2-phenylethanol. EOs concentrations in hydrosols or cold storage are not sufficient to insure microbiological stability. Additional hurdles such as chemical preservatives or aseptic packaging will be necessary to insure microbial stability.

Keywords: Orange blossom water, Rose water, Essential oils, Carbohydrate, Spoilage, Distillation.

Introduction

Hydrosols are co-products from the steam distillation or hydrodistillation of aromatic plants for the production of the much less abundant but highly valuable essential oils (EO). These are mainly used as food flavoring substances in a wide range of pastries and beverages of the Mediterranean basin and the Middle East. The steam distillation or hydrodistillation process of aromatic plants produces two non-miscible phases: the EO phase containing the major part of volatile compounds, and the hydrosol phase composed of condensed water and of a low amount of dissolved EO (usually less than 1 g/L) that confers the organoleptic properties. At higher concentrations, EOs are not miscible and separate naturally from hydrosol (Fernandez, André *et al.* 2014).

EO in orange blossom and rose hydrosols are mostly composed of terpenoids and alcohols, such as linalool and α -terpineol in orange blossom, 2-phenylethanol, citronellol, and geraniol in rose sp. hydrosols (Jeannot, Chahboun *et al.* 2005; Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009). Distillation of orange blossom (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.) results in the production of Neroli EO (in a yield of about 0.1 % of the distillation products) and of its co-product, the orange blossom hydrosol (also known as orange blossom water) in a yield of 99.9 %. The major producers are Morocco and Tunisia, with annual productions of about 800 t and 300 t, respectively (Albert Vieille SAS unpublished data). Rose C. flower hydrosol (*Rosa centifolia* L.) is usually obtained by steam distillation, with quite a low yield in EO (about 0.01 %). Most of the production comes from France. Rose D. flowers (*Rosa damascena* Miller) hydrosol (Damascus rose water) is usually obtained by hydrodistillation, co-produced with 0.025% of EO, and most of the 1000 t annual world production comes from Bulgaria and Turkey (Fernandez, André *et al.* 2014).

Hydrosols contain EOs known for their antimicrobial effects, in particular against foodborne pathogens (Burt 2004; Al-Turki 2007; Chorianopoulos, Giaouris *et al.* 2008; Fisher and Phillips 2008; Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011; Tornuk, Cankurt *et al.* 2011; Ammar, Bouajila *et al.* 2012; Voon, Bhat *et al.* 2012; Sagdic, Ozturk *et al.* 2013). Moreover the same hydrosols must comply with professional microbiological standards that recommend a total bacteria count lower than 200 CFU/mL, a total mold and yeast count lower than 20 CFU/mL, and absence in 1 mL of the human pathogens *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (ANSM 2012; Council of Europe 2014). However, there is some concern about their microbiological stability, and about proliferation of bacteria or molds that contributes to hydrosol decay (Fernandez, André *et al.* 2014; Watt 2015). EO concentrations may therefore not be high enough for microbiological control. The aim of this work was to characterize the microbiota of rose and orange flower hydrosols of diverse origins, its behavior in relation to chemical

composition and storage conditions, and its impact on the aromatic properties of the products.

Materials and Methods

Origin and preparation of the analyzed hydrosols

Samples of commercial rose (*Rosa damascena* Miller and *Rosa centifolia* L.) and orange blossom (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.) hydrosols were collected by Albert Vieille SAS (Vallauris, France) from different manufacturers at different locations in Europe and around the Mediterranean basin. Selected and examined hydrosols were in conformity with market practices. These hydrosols were produced by steam distillation or hydrodistillation of fresh flowers (Figure 37). A second distillation of hydrosols may occasionally be performed, in case of non-compliance to microbiological or aromatic standards. For all hydrosols analyzed in the present work, volumes of 5 L to 10 L were sampled at different times of processing and storage (Tableau 11). Then, 50 mL to 100 mL aliquots of each hydrosol sample were aseptically separated for chemical and microbiological analysis. Among these, four hydrosol samples have been followed during a three-month storage period. Two rose C. samples (#18 and #22), and two orange blossom samples (#7 and #8) hydrosols were collected in the industrial storage and collection tanks (therefore not maintained in a sterile environment and/or packaging during a few days after distillation) and poured into 10 L sterile containers stored at 5°C (samples #18.1, #22.1, #7.1, and #8.1) or at ambient temperature (samples #18.2, #22.2, #7.2, and #8.2). Changes in bacterial populations were followed over a three-month storage period by sampling 50 mL volumes at regular time intervals. Two hundred g of fresh rose C. flowers were collected before distillation (#17) for determination of microbiological counts.

Tableau 11 Description of orange blossom (*Citrus aurantium*), rose D. (*Rosa damascena*), and rose C. (*Rosa centifolia*) hydrosol samples

Hydrosol	Sample #	Manufacturer; Year of production; Production country	Simple or double distilled	Filtration	Sampling location	Storage temperature (°C); Storage duration before analysis	Storage conditions
<i>Citrus aurantium</i>	1	A ; 2013 ; TN	Simple	NK	Storage tank	NK ; 3 months	not sterile
	2	B ; 2013 ; FR	Simple	NK	Storage tank	NK ; 20 days	not sterile
	3	C ; 2013 ; TN	Simple	NK	Storage tank	NK ; 3 months	not sterile
	4	D ; 2013 ; TN	Simple	NK	Storage tank	ambient ; 3 months	not sterile
	5	A ; 2013 ; TN	Simple	NK	Storage tank	NK ; 9 months	not sterile
	6.1 ^a	B ; 2014 ; FR	Double	No	Collection tank	5°C ; 10 days	not sterile
	6.2 ^a	B ; 2014 ; FR	Double	No	Collection tank	20°C ; 10 days	not sterile
	6.3 ^a	B ; 2014 ; FR	Double	Yes	Storage tank	5°C ; 10 days	not sterile
	7.1 ^a	D ; 2014 ; TN	Simple	No	Collection tank	5°C ; 3 days	not sterile
	7.2 ^a	D ; 2014 ; TN	Simple	No	Collection tank	20°C ; 3 days	not sterile
<i>Rosa damascena</i>	8.1 ^a	E ; 2014 ; TN	Simple	No	Storage tank	5°C ; 7 days	not sterile
	8.2 ^a	E ; 2014 ; TN	Simple	No	Storage tank	20°C ; 7 days	not sterile
	9 ^{a,b}	F ; 2014 ; FR	Simple	No	Florentine flask	5°C ; 5 hours	sterile
	10	D ; 2014 ; TN	Simple	NK	Storage tank	ambient ; 2 months	not sterile
	11	G ; 2013 ; MA	Simple	NK	Storage tank	NK ; 4-6 months	not sterile
	12	B ; 2013 ; FR	Simple	NK	Storage tank	5°C ; 4 days	not sterile
	13	H ; 2013 ; BG	Simple	NK	Storage tank	NK ; 4-6 months	not sterile
	14	I ; 2013 ; MA	Simple	NK	Storage tank	NK ; 4-6 months	not sterile
	15	J ; 2013 ; TR	Simple	NK	Storage tank	NK ; 4-6 months	not sterile
	16	K ; 2013 ; BG	Simple	NK	Storage tank	NK ; 4-6 months	not sterile
<i>Rosa centifolia</i>	17 ^a	B ; 2013 ; FR	Simple	No	Florentine flask	20°C ; 7 hours	sterile
	18.1 ^a	B ; 2013 ; FR	Simple	Yes	End of filtration	5°C ; 1 month	not sterile
	18.2 ^a	B ; 2013 ; FR	Simple	Yes	End of filtration	20°C ; 1 month	not sterile
	18.3 ^a	B ; 2013 ; FR	Simple	Yes	Storage tank	5°C ; 1 month	not sterile
	19	B ; 2012 ; FR	Simple	Yes	Storage tank	NK ; 13 months	not sterile
	20	B ; 2012 ; FR	Simple	Yes	Storage tank	NK ; 13 months	not sterile
	21.1 ^a	B ; 2014 ; FR	Simple	No	Florentine flask	5°C ; 6 hours	sterile
	21.2 ^a	B ; 2014 ; FR	Simple	No	Florentine flask	20°C ; 6 hours	sterile
	22.1 ^a	B ; 2014 ; FR	Simple	Yes	Storage tank	5°C ; 1 month	not sterile
	22.2 ^a	B ; 2014 ; FR	Simple	Yes	Storage tank	20°C ; 1 month	not sterile

^a samples analyzed at several time intervals during a 3-month storage ; ^b laboratory (Albert Vieille SAS) distillation; NK: Not known. BG: Bulgaria; FR: France; MA: Morocco; TN: Tunisia; TR: Turkey.

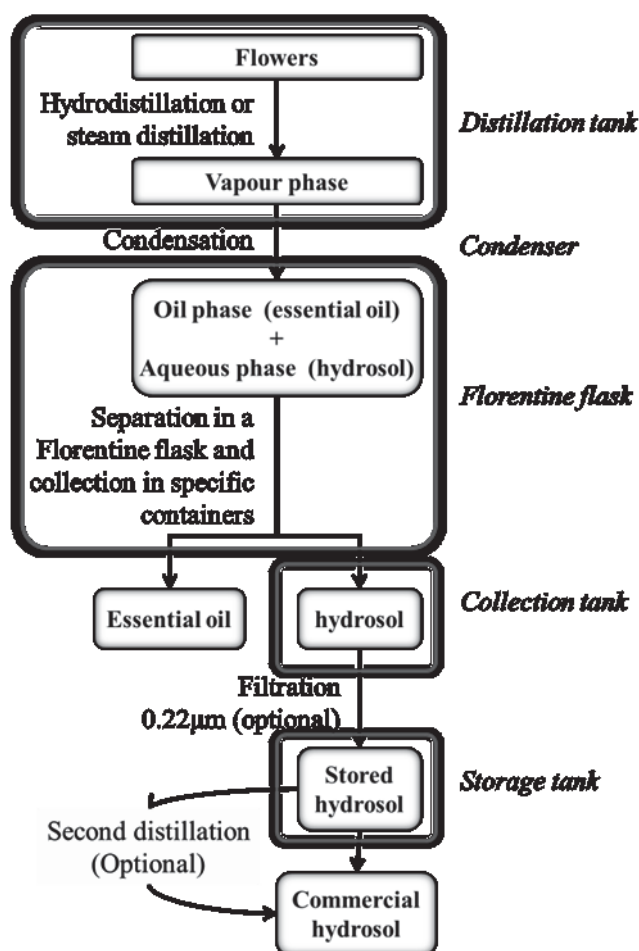


Figure 37 Diagram of hydrosol production showing the product at different stage of processing, and physical and chemical processes applied to the product. Containers and process equipment are indicated in italics. Products and fractions are in bold characters. * indicates sampling locations.

Chemical analysis

- **Extraction, identification and quantification of volatile compounds**

Volatile compounds were extracted from 4 mL volumes of hydrosol by three successive liquid-liquid extractions with 1.5 mL of n-hexane (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Water traces remaining in the organic phase were absorbed on Na₂SO₄ (VWR). Volatile compounds were analyzed and quantified with a gas Chromatograph mass spectrometer (GCMS-QP 2010; Shimadzu, Kyoto, Japan). Samples were injected with an auto-sampler (AOC-5000; Shimadzu) in splitless mode at 250°C (purge opened after 0.5 min), then separated with a UBWAX column (30 m × 0.25 mm, 0.5 µm) (Interchim, Montluçon, France). The carrier gas was helium at a constant velocity of 35.5 cm/s. The oven program

temperature was as follows: 50 °C, 4 °C/min to 230 °C and 5 min hold time. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV in the m/z range 29–450 at a speed of 1.7 scans/s. The temperatures of the ion source and of the transfer line were respectively 200 °C and 250°C. Mass spectral matches were performed by comparison of experimental mass spectra with the ones of the Wiley Mass Spectral library (8th edition) and NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 08). Experimental retention indices (RI) were determined for 31 constituents by injecting a series of n-alkanes (C7–C30) (Supelco, Bellefonte, USA) and were then compared to the values given in the literature (www.pherobase.com and www.flavornet.org) to confirm identification. Quantifications was done by area comparisons, using n-hexadecane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) as internal standard, and measurement of the response factors of pure linalool, α -terpineol, citronellol, nerol, geraniol (all Sigma-Aldrich), and 2-phenylethanol (Merck, Darmstadt, Germany), representing respectively 85 % and 75 % of volatile compounds of *Rosa sp.* and orange blossom hydrosols. Volatile compound concentrations expressed in mg/L or % surface area were the mean of two replicate extractions. The reproducibility of extractions and analyses was estimated by % mean deviations. These were lower than 5.3 % for EO concentrations and lower than 3.4 % for peak areas of volatile compounds.

- **Determination of pH, carbohydrate and amino acid concentrations**

The hydrosol pHs were measured at ambient temperature with a pH electrode (Hanna, Tanneries, France) and a pH meter (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). The pH meter was calibrated with freshly prepared buffers (pH 4.00 and pH 7.01) (Merck).

Carbohydrates concentrations have been determined by the phenol sulfuric-acid method (Dubois, Gilles *et al.* 1956) on the residues of three replicate freeze-dried samples of 50 mL hydrosol volumes each solubilized again in 0.5 mL of MilliQ plusTM water (Merck Millipore, Billerica, USA), 0.5 mL of a 50 g/L phenol solution (Fisher Scientific, Illkirch, France) and 2.5 mL of pure sulfuric acid (VWR). After 30 min of reaction, the A_{485} was determined by spectrophotometric measurement (Xenius, Safas, Monaco). A calibration curve was set from 0.01 g/L to 0.08 g/L of a sucrose water solution (Sigma-Aldrich) ($R^2 = 0.99$).

Amino-acid concentration was determined using a method adapted from previously published ones (Frutos, Torrado *et al.* 2000; Sun, Lin *et al.* 2006). The calibration curve and the samples were prepared at the same time. For external calibration, final concentration ranged from 0.04 g/L to 0.07 g/L of glycine (Sigma-Aldrich) in MilliQ plusTM water ($R^2 = 0.99$). Each residue of three replicate 50 mL samples of freeze-dried hydrosols was dissolved in 1 mL of MilliQ plusTM water. A 400 μ L aliquot of the dissolved residue was transferred into a

screw-capped microtube. Then, 200 μL of 2 % (wt/vol) Ninhydrine reagent (Sigma-Aldrich) in MilliQ plusTM water was added in all microtubes, heated in a dry bath (Lab-line, Maharashtra, India) at 95 °C for 15 min, and then cooled to room temperature in an ice bath. After 10 s vortexing, 300 μL of each sample was transferred into a 96-well microplate (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France). A_{570} was determined by spectrophotometric measurements (Xenius, Safas) within 20 min following heating, i.e. before initiation of a pronounced decrease in coloration.

- **Laboratory distillation of solutions of organic compounds**

Solutions at 20 g/L of autolytic yeast extract (Biokar Diagnostic, Beauvais, France), glycine (Sigma-Aldrich) and sucrose (Sigma-Aldrich) were hydrodistilled in the laboratory in respectively 50 mL, 50 mL, and 100 mL of MilliQ plusTM water, using a 500 mL distillation flask heated in a heating mantle equipped with a magnetic stirrer, a still head equipped with a thermometer, and a condenser. Distillate products were collected in a graduated cylinder. The dry weight content in the distillation product (condensate) of the yeast extract solution was determined after three days drying in an oven at 73 °C. The amino-acid content in the glycine solution condensate and the carbohydrate concentration in the sucrose solution were determined using the previously described methods (paragraphes 4.3.1.3 et 4.3.1.4).

Microbiological counts and changes with storage time

Microbial population was first determined in a sample of freshly picked rose flowers. Three replicates of 15 g fresh rose C. flowers were blended in 100 mL sterile demineralized water using a Stomacher[®] 400 blender (Seward, Worthing, UK) (2 x 60 s), and 100 μL of the appropriate decimal dilutions were spread onto Plate Count Agar (PCA) (Biokar Diagnostics) and Yeast Glucose Chloramphenicol agar (YGC) (Biokar Diagnostics), to enumerate, respectively, aerobic mesophilic bacteria and yeasts and molds. Counts of colony-forming units (CFU) of aerobic mesophilic bacteria in hydrosols were performed by spreading 100 μL of the appropriate decimal dilutions of hydrosols in sterile demineralized water onto 10 fold-diluted PCA, complemented with agar (Biokar Diagnostics) to get a final 12 g/L agar concentration (DPCA), unless otherwise specified. Previous tests in our laboratory consistently showed a better recovery on DPCA than on PCA (data not shown). All Petri dishes were incubated at 30 °C for two days before colony counts were recorded. Counts of microbial cells in hydrosols were performed using a Malassez counting chamber and an Olympus BX50 phase-contrast microscope at X400 magnification.

Isolation and identification of bacteria

Approximately three to four colonies per hydrosol sample, from the ones grown on DPCA plates used for microbiological counts, were selected for their morphological differences, and observed for size and shape by phase-contrast microscopy at X1000 magnification. All colonies observed on DPCA were composed of bacteria. They were then subcultured three times on DPCA for purity, and then picked and stored at -80 °C in a 400 mL/L glycerol solution (Sigma-Aldrich).

In total 71 bacteria were isolated from hydrosols and were first analyzed by 16S ribosomal RNA (*rrs*) gene sequencing. Then, to determine clonal isolates, strains with similar *rrs* gene partial sequence isolated from the same hydrosol sample were typed by a molecular typing (M13-PCR). One representative strain of each clone was selected. To differentiate species of a same genus with non-discriminative *rrs* gene partial sequence, a phenotypic characterization was done. Detailed procedure was as follows.

DNA was extracted from purified colonies, suspended in 400 µL of ultrapure sterile water and grinded with 0.1 µm silica beads (Bio Spec, Bartlesville, USA) in screw-capped microtubes, and then mixed to 25 µL sodium dodecyl sulfate (200 g/L), 100µL NaClO₄ (5 mol/L), and 600 µL of pure chloroform (all Sigma-Aldrich). Samples were kept on ice all along the extraction. After centrifugation (17000 x g), 1 mL of freezing absolute ethanol (Sigma-Aldrich) was added to the aqueous phase into a clean microtube. The DNA precipitate was retrieved and washed with 70 % ethanol (Sigma-Aldrich), dried, and suspended in 100 µL ultrapure sterile water. RNase (Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland) (0.5 mg/mL) was added and the sample was heated at 65 °C for 15 min, and then stored at -20 °C until further analysis.

The *rrs* gene corresponding to positions 9 to 1548 on *B. subtilis rrs* gene was amplified using two modified primers (FD1 MOD: AGA-GTT-TGA-TC(A,C)-TGG-CTC-AG) and (RD1 MOD: GG(A,C)-TAC-CTT-GTT-ACG-A(T,C)T-TC) as previously described (Guinebretiere, Berge *et al.* 2001) with minor differences in the number of cycles (n = 35) and the use of a PCR 9700 thermocycler (Life technologies, Carlsbad, USA). A positive amplification was checked by revelation of the expected size band in a 5 µL volume of each amplicon deposited onto a 100 mL electrophoresis gel of Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (0.5x) (Serva, Heidelberg, Germany) mixed with 10 g/L agarose (Lonza Seakem® LE, Basel, Switzerland). Gels were stained with 20 µL of ethidium bromide (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France), and results were read after 30 minutes migration at 100 V in TAE (0.5x) electrophoresis buffer. PCR products were purified and sequenced by GATC Biotech® (Constance, Germany) in a

Sanger ABI 3730xl, using the primer S6 (5'–GTATTACCGCGGCTGCTG–3', position 518-534 of *Escherichia coli rrs* gene). Identifications of hydrosol bacteria were then performed by comparison of the resulting partial *rrs* sequences to the *rrs* gene sequences of type strains on NCBI nucleotide BLAST library.

Bacterial clones among isolates were detected by M-13 PCR (Guinebretiere and Nguyen-The 2003). Fragments were revealed on an electrophoresis gel made of 100 mL TAE buffer mixed with 15 g/L agarose and stained with 20 µL ethidium bromide, using the molecular weight marker 'Smart Ladder' (Eurogentec, Seraing, Belgium). A phenotypic characterization was performed to differentiate 15 strains of *Burkholderia* sp. having the same *rrs* gene partial sequence (*Bu. lata*, *Bu. cepacia*, and *Bu. vietnamiensis*; *Bu. lata* and *Bu. ambifaria*; *Bu. lata*, *Bu. cepacia* and *Bu. multivorans*) and 18 strains of *Pseudomonas* sp. (*P. migulae* and *P. panacis*; *P. veronii* and *P. extremaustralis*), using pure colonies subcultured on DPCA. *Burkholderia* species were identified by their differences in 42 °C growth capacity, hemolysis and gelatinase activity, NO₂ reduction and β-galactosidase activity (Vanlaere, Baldwin *et al.* 2009). *Pseudomonas* species were differentiated by gelatinase and hemolysis activity (Ivanova, Gorshkova *et al.* 2002; Park, Lee *et al.* 2005). NO₂ reduction, β-galactosidase activity, and glucose metabolism were tested on API 20 E[®] (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) using NaCl (VWR) 8.5 g/L as cell medium. Gelatinase tests were performed on Petri dishes as previously described by (Smith and Goodner 1958), using gelatin at 40.0 g/L (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), and increased concentrations of autolytic yeast extract (3.0 g/L), and peptone (5.0 g/L) (Sigma-Aldrich). Hemolysis tests were performed on horse blood agar plates (BD Columbia, Le Pont de Claix, France) incubated at 30°C, using *Bacillus cereus* ATCC 14579 as positive control. Growth capacity at 42 °C was tested by formation of visible colonies on DPCA plates incubated for seven days.

Changes in profiles of volatile compound in hydrosols inoculated with bacteria

Purified colonies of *Novosphingobium capsulatum* (strain IA_FO_33) and *Burkholderia vietnamiensis* (strain IA_FO_28) isolated from one hydrosol (sample #8.2 stored at ambient temperature) were subcultured overnight at 30 °C under shaking at 200 rpm into three replicate 5 mL volumes of a growth medium composed of 50 mg/L tryptone (Biokar Diagnostic), 25 mg/L autolytic yeast extract (Biokar Diagnostic) and 10 mg/L D-(+)-glucose (Sigma-Aldrich). Then, each replicate of the previous pure culture was inoculated at a final concentration of approximately 10³ CFU/mL into 5 mL volumes of filter-sterilized (0.22 µm) orange blossom or rose C. hydrosols. Orange blossom hydrosol was supplemented with 20 µL of a heat-treated (20 min at 121 °C) bacteria pellet obtained from 100 mL of the

heavily contaminated hydrosol #8.2, washed and suspended in demineralized water to allow *Novosphingobium capsulatum* growth. Concentrations in volatile compounds and microbial counts were determined at inoculation time (t_0), and after 10-day incubation at 30 °C under shaking at 200 rpm as described in section 2.2.1. and 2.3.

Statistical analysis

The significance of the differences in the statistical distributions of two samples was evaluated with the Mann-Whitney test and using the XLstat software (Addinsoft, Paris, France).

Results and discussion

Hydrosols composition

- **Volatile compounds**

EO concentrations and percentage area of 31 volatile compounds of nine orange blossom, six rose D., and eight rose C. hydrosols produced at different locations in Europe and around the Mediterranean basin are presented in Tableau 12. The EO concentration of orange blossom hydrosols analyzed in this work (median [minimal value; maximal value]) was 677 mg/L [276; 866]. The major compounds were linalool and α -terpineol (median surface areas at 44.1 % and 23.7 %, respectively), and to a lesser extent methyl anthranilate, phenylacetonitrile, nerol and geraniol (median surface areas at 4.2 %, 2.9 %, 2.5 % and 1.6 %, respectively). The EO concentrations of the rose hydrosols (median [minimal value; maximal value]) were 205 mg/L [132; 597] for rose D. hydrosols, and 116 mg/L [100; 482] for rose C. hydrosols. The major compounds were 2-phenylethanol (median surface areas at 25.0 % and 45.6 % for rose D. and rose C., respectively), citronellol (median surface areas at 20.9 % and 24.6 %, respectively), and geraniol (median surface areas at 21.2 % and 11.3 % respectively). Concentrations of a few compounds greatly varied among samples. For example, surface areas of 6-methyl-5-hepten-2-one varied between 0.01 % and 22.0 % in orange blossom hydrosols, surface areas of geraniol and 2-phenylethanol varied respectively between 0.6 % and 30.7 % and between 10.7 % and 80.3 % in rose D. hydrosols, and amounts of citronellol varied between 11.2 % and 58.4 % in rose C. hydrosols. Volatile profiles correspond to the ones already observed in previous studies and industrial samples of rose and orange blossom hydrosols and differences in the concentrations were significant ($P < 0.05$) only for

few compounds. The major compounds in the samples analyzed in this work, i.e. linalool and α -terpineol in orange blossom hydrosols, 2-phenylethanol, citronellol and geraniol in both rose sp. hydrosols, were also in high amounts in hydrosols analyzed in previous studies, and variations in 6-methyl-5-hepten-2-one, linalool, α -terpineol, citronellol, geraniol, and 2-phenylethanol amounts among samples for example were also previously reported (Agarwal, Gupta *et al.* 2005; Aslam Khan and Shoaib Ur 2005; Jeannot, Chahboun *et al.* 2005; Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009; Mahboubifar, Shahabipour *et al.* 2014); Albert Vieille SAS unpublished data) (Tableau 12).

The major compounds contained in the EO phase of rose and orange blossom hydrosols are known for their antimicrobial properties. For example, linalool exhibits an inhibitory activity against *E. coli* and *L. monocytogenes* with a minimal inhibitory concentrations (MIC) of 200 mg/L (Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011), of 900 mg/L against some strains of *E. coli*, *S. aureus*, and *Ba. cereus*, and no inhibitory activity (MIC >900 mg/L) against other strains of *E. coli*, *S. aureus*, *Ba. cereus*, and *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, and *Saccharomyces cerevisiae* (Cosentino, Tuberoso *et al.* 1999); the MIC of 2-phenylethanol against *E. coli* and *Ralstonia solanacearum* is 200 mg/L (Zhu, Zhou *et al.* 2011); the MICs of α -terpineol against *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus*, and *Ba. cereus* are between 225 mg/L and 900 mg/L (Cosentino, Tuberoso *et al.* 1999); geraniol's MIC against *E. coli* and *Salmonella* Typhimurium is 500 mg/L, and 1000 mg/L against *L. monocytogenes* (Burt 2004). EOs show better antibacterial activity against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria (Burt 2004). Linalool concentration observed in orange blossom hydrosol was close to the MIC against *E. coli* and *L. monocytogenes* (Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011). However the concentrations of the other compounds in orange blossom, rose C. and rose D. flower hydrosols were 1.4 to >1000-fold lower than the reported MICs of pure compound solutions. These concentrations are likely not sufficient to allow microbiological stability, as already shown in rose flower hydrosol (Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009).

Tableau 12 Essential oil concentrations and area percentages of 31 volatile compounds of orange blossom (*Citrus aurantium*), rose D. (*Rosa damascena*), and rose C. (*Rosa centifolia*) hydrosols, and comparison with literature and industrial data.

		Hydrosols						
		<i>Citrus aurantium</i>		<i>Rosa damascena</i>		<i>Rosa centifolia</i>		
		This work	literature and industrial data	This work	literature and industrial data	This work	literature and industrial data	
		n=9	n=43 ^a	n=6	n=24 ^b	n=8	n=15 ^c	
		Median[<i>min</i> ; <i>max</i>]	Median[<i>min</i> ; <i>max</i>]	Median[<i>min</i> ; <i>max</i>]	Median[<i>min</i> ; <i>max</i>]	Median[<i>min</i> ; <i>max</i>]	Median[<i>min</i> ; <i>max</i>]	
Essential oil concentration (mg/L)		677[276 ; 866]	477[210 ; 1075]	205[132 ; 597]	240[41 ; 830]	116[100 ; 482]	165[50 ; 519]	
RI ^d								
RI ^d and area	1348	6-methyl-5-hepten-2-one	0.2[0.01 ; 22.0]	1.8[0.03 ; 10.5]	0.2[<0.01 ; 5.4] *	<0.01[<0.01 ; 0.04]	0.01[<0.01 ; 1.4]	0.2[0.1 ; 1.5]
% of	1360	Rose oxide	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	1.2[<0.01 ; 1.8]	0.3[<0.01 ; 1.8]	0.7[<0.01 ; 2.0] *	0.2[<0.01 ; 0.4]
aromatic	1398	<i>cis</i> -3-hexenol	0.02[<0.01 ; 0.1]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
compounds	1450	<i>cis</i> -linalool oxide	5.7[1.4 ; 9.6]	4[1.0 ; 8.8]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; 0.7]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; 0.4]
	1473	6-methyl-5-hepten-2-ol	0.4[0.02 ; 2.2] * ^e	<0.01[<0.01 ; 10.0]	0.04[<0.01 ; 10.0]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	0.04[<0.01 ; 0.6]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	1483	<i>trans</i> -linalool oxide	3.4[0.7 ; 5.7]	2.4[0.5 ; 5.7]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; 0.5]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; 0.2]
	1543	Benzaldehyde	<0.01[<0.01 ; 0.1] *	0.4[<0.01 ; 7.3]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; 0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	1563	linalool	44.1[24.9 ; 64.9]	45.4[23.1 ; 67.3]	1.9[0.6 ; 7.1]	3.1[1.0 ; 8.0]	2.0[0.4 ; 4.6]	1.0[0.03 ; 5.0]
	1613	4-terpineol	1.7[0.4 ; 2.6]	1.5[0.1 ; 3.5]	1.1[<0.01 ; 1.9] *	0.4[<0.01 ; 0.9]	0.1[<0.01 ; 0.4]	0.2[<0.01 ; 1.0]
	1670	2-phenyl acetaldehyde	0.03[<0.01 ; 2.6]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	0.04[<0.01 ; 0.1]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	0.01[<0.01 ; 1.2]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	1690	Neral	0.03[<0.01 ; 0.1]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	0.7[<0.01 ; 1.8]	0.1[<0.01 ; 1.0]	0.1[<0.01 ; 1.0]	0.1[<0.01 ; 0.5]
	1710	Alpha terpineol	23.7[10.7 ; 38.0]	22[11.3 ; 36.3]	0.9[<0.01 ; 4.9]	1.3[<0.01 ; 4.7]	0.6[0.1 ; 11.4]	0.4[<0.01 ; 1.7]
	1745	Geraniol	0.1[<0.01 ; 0.2]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01] *	0.3[<0.01 ; 1.3]	<0.01[<0.01 ; <0.01] *	0.2[<0.01 ; 3.5]
	1765	Neryl acetate	0.1[<0.01 ; 0.8]	0.1[<0.01 ; 0.4]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	1768	Geranyl acetate	0.1[<0.01 ; 1.4]	0.1[<0.01 ; 1.8]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	0.02[<0.01 ; 0.3]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	0.1[0.04 ; 1.9]
	1775	Citronellol	0.1[<0.01 ; 0.7]	0.01[0.01 ; 0.01]	20.9[11.7 ; 27.3]	17.1[2.3 ; 38.7]	24.6[11.2 ; 58.4] *	16.5[3.6 ; 22.8]
	1809	Nerol	2.5[0.1 ; 2.8]	2.3[0.1 ; 3.5]	10.8[1.3 ; 15.1]	9.3[<0.01 ; 16.5]	3.8[2.0 ; 5.1]	4.0[0.6 ; 5.7]
	1824	2-Phenetyl acetate	0.01[<0.01 ; 0.1]	<0.01[<0.01 ; 0.2]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; 0.8]	<0.01[<0.01 ; <0.01] *	0.2[<0.01 ; 0.5]
	1857	Geraniol	1.6[0.1 ; 8.0]	3.6[0.1 ; 7.8]	21.2[0.6 ; 30.7]	18.7[<0.01 ; 31.3]	11.3[6.4 ; 13.5]	7.4[2.7 ; 15.8]
	1886	Benzyl alcohol	<0.01[<0.01 ; 0.02]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	0.3[0.1 ; 1.7]	0.1[<0.01 ; 1.1]	0.4[0.1 ; 0.7] *	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	1925	2-Phenyl ethanol	1.5[0.2 ; 5.2]	2[0.1 ; 7.9]	25.0[10.7 ; 80.3]	32.8[13.3 ; 85.4]	45.6[24.2 ; 54.2] *	54.2[40.0 ; 79.0]
	1940	Phenylacetonitrile	2.9[0.6 ; 4.5] *	0.1[<0.01 ; 5.0]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; 0.3]
	1953	Jasmone	0.1[<0.01 ; 0.1]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01] *	0.6[<0.01 ; 1.0]
	2024	Methyl eugenol	0.04[<0.01 ; 1.3]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	2.7[0.7 ; 5.6]	1.9[<0.01 ; 4.3]	2.4[2.0 ; 3.8] *	1.3[0.1 ; 2.3]
	2053	Nerolidol	0.03[<0.01 ; 1.6]	0.2[<0.01 ; 1.4]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	2177	Eugenol	<0.01[<0.01 ; 0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	2.1[0.1 ; 10.9]	3.2[<0.01 ; 8.6]	3.1[1.4 ; 3.5]	1.8[0.4 ; 4.0]
	2211	4-vinylguaiaicol	0.1[<0.01 ; 1.6]	<0.01[<0.01 ; 1.4]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	2250	Methyl anthranilate	4.2[2.8 ; 5.3]	3.4[1.0 ; 8.6]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]
	2299	Geranic acid	0.1[<0.01 ; 1.1]	<0.01[<0.01 ; 2.0]	0.02[<0.01 ; 0.1]	<0.01[<0.01 ; 2.1]	<0.01[<0.01 ; 0.2]	<0.01[<0.01 ; 3.9]
	2429	Farnesol	0.1[<0.01 ; 1.1]	0.2[<0.01 ; 2.7]	<0.01[<0.01 ; 0.2]	<0.01[<0.01 ; 0.5]	<0.01[<0.01 ; <0.01] *	0.2[<0.02 ; 0.4]
	2455	Indole	0.8[<0.01 ; 1.3]	0.8[<0.01 ; 3.2]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]	<0.01[<0.01 ; <0.01]

^a Jeannot et al. (2005), and Albert Vieille SAS unpublished data; ^b Ulusoy et al. (2009), Mahboubifar et al. (2014), and Albert Vieille SAS unpublished data;

^c Aslam Khan (2005) and Albert Vieille SAS unpublished data; ^d experimental retention index on polar column (ubwax).

^e for each hydrosol and each volatile compound,

* indicates a significant difference between samples analyzed in the present work, and literature and industrial data at $P < 0.05$ (Mann-Whitney test).

- **Non-volatile compounds and pH**

Hydrosol pHs were comprised between pH 4 and pH 7 and were unrelated to area and year of production, and to type of distilled flower (Tableau 13). The dry matter contents were comprised between 95 and 702 mg/L, except in a laboratory distillate of orange blossom (*Citrus aurantium* # 9, Tableau 13) where it was 4.0 mg/L. Carbohydrates were detected at concentrations of (mean \pm standard deviation, sd) 0.21 ± 0.01 mg/L and 0.25 ± 0.02 mg/L in two freshly distilled rose C. hydrosols, and of 0.38 ± 0.03 mg/L in a freshly distilled orange blossom hydrosol. In these hydrosols, organic and amino acid concentrations were lower than the threshold of detection, respectively 0.7 mg/L and 2 mg/L. The presence of low amounts of non-volatile compounds in freshly distilled hydrosols suggests their entrainment by steam. Laboratory distillations of solutions of pure non-volatile compounds of yeast extract, glycin, and sucrose, each at a concentration of 20 g/L, confirmed this hypothesis. Respectively 0.74 ± 0.4 % (n = 3), 3.5 ± 0.4 % (n = 3), and 0.31 % (n=1) of these compounds were found in the distillation products. The entrainment of water droplets during evaporation has been previously described (Cosandey and von Rohr 2001; Prabhudharwadkar, More *et al.* 2010; Nakoryakov, Misyura *et al.* 2012). Consequently the distillation process may enrich the hydrosols in some compounds other than EOs, which could be used as nutrients by microorganisms.

Tableau 13 Composition, pH of, and bacterial counts in orange blossom (*Citrus aurantium*), rose D. (*Rosa Damascena*), and rose C. (*Rosa centifolia*) hydrosols from diverse origins and stored in different conditions

Hydrosol	Sample ^a #	pH	Dry matter (mg/L) ^b	Carbohydrates (mg/L)	Microbiological counts	
					log ₁₀ CFU/mL	cell/mL
<i>Citrus aurantium</i>	1	4.8	253 \pm 12	NT	6.4	6.2
	2	4.2	319 \pm 21	NT	4.9	4.6
	3	5.6	384 \pm 6.7	NT	6	6
	4	4.7	95 \pm 3.2	NT	4.1	4
	5	4.5	NT	NT	5.3	6.6
	6.1 ^c	6.8	164 \pm 17	NT	4.5	4.7
	6.2 ^c	7	NT	NT	4.5	4.8
	6.3 ^c	6.5	NT	NT	4.2	ND
	7.1 ^c	4.1	NT	NT	6.1	6.1
	7.2 ^c	4.1	NT	NT	5.9	5.9
8.1 ^c	4	NT	NT	4.5	6.1	
8.2 ^c	4.4	NT	NT	6.4	7.1	
9 ^{c,d}	4.7	4.0 \pm 2.6	0.38 \pm 0.03	<0.7	<4.00	
10	4	NT	NT	6.3	6.5	
<i>Rosa damascena</i>	11	4.8	NT	NT	ND	5.1
	12	7	NT	NT	3.9	ND
	13	6.4	NT	NT	ND	6
	14	4	NT	NT	7	7
	15	4.7	NT	NT	5.5	5.5
	16	5.4	NT	NT	3.8	5.7

<i>Rosa</i>	17 ^c	6.9	348 ±25	0.25 ± 0.02	<0.7	<4.00
<i>centifolia</i>	18.1 ^c	7.1	702 ±88	NT	5.8	5.8
	18.2 ^c	7	641 ±94	NT	5.8	5.8
	18.3 ^c	6.4	NT	NT	4.8	5.4
	19	4	NT	NT	5.5	6
	20	6.7	NT	NT	4.6	4.8
	21.1 ^c	4.8	281 ±13	0.21 ± 0.01	<0.7	<4.00
	21.2 ^c	5.6	NT	NT	<0.7	<4.00
	22.1 ^c	5.9	NT	NT	7	6.6
	22.2 ^c	5.6	NT	NT	7.1	7.3

^aSee Tableau 11

^bmean ± sd, n = 3 analytical replicates of each sample

^cSamples analyzed at several time intervals during a 3-month storage

^dlaboratory (Albert Vieille SAS) distillation; NT, not tested; ND, not determined

Microbiological counts and changes with storage time

Microbiological counts in fresh rose *C.* flowers were 4.9 log₁₀ CFU/g (±0.3) for bacteria and 3.9 log₁₀ CFU/g (±0.5) for yeasts and molds. Approximately 300 kg of flowers and 750 L of water are mixed for distillation. At the end of the distillation, the microbial population in the hydrosol was lower than 0.5 log₁₀ CFU/mL. The distillation process therefore achieved at least a 4 log₁₀ CFU/mL (±0.3) reduction for bacteria and 3 log₁₀ CFU/mL (±0.5) reduction for yeasts and molds. The hydrosols collected in a sterile container at the end of the distillation line (#9, #17, #21.1 and #21.2, Tableau 11) showed counts remaining low (<0.5 log₁₀ CFU/mL) during a three-month storage period.

Two orange blossom hydrosol samples (#7 and #8) and two rose *C.* (#18 and #22) were stored at 5 °C (samples #7.1, #8.1, #18.1 and #22.1) or at ambient temperature (samples #7.2, #8.2, #18.2 and #22.2). Changes in bacterial populations were followed over a three-month storage period (Figure 38). In orange blossom hydrosols, maximal bacterial populations were reached within 10 days at ambient temperature. The two samples of this hydrosol stored at 5 °C showed two different patterns: either bacteria counts that plateaued at 6 to 7 log₁₀ CFU/mL over the examined storage period (Figure 38, A), i.e. at the maximal counts observed in the other studied samples, or a pronounced decrease in the microbial counts, which were lower than the threshold of enumeration (i.e. <0.5 log₁₀ CFU/ml) after 80 days (Figure 38, B) (Tableau 13). In the two rose *C.* hydrosols, maximal bacteria populations (about 6 to 7 log₁₀ CFU/ml) were reached within a few days when stored at ambient temperature, and in fifteen days to two months when stored at 5 °C (Figure 38, C and D). For hydrosols analyzed at variable times during shelf-life, total bacteria counts were between 4 and 7 log₁₀ CFU/mL (Tableau 13). High (or low) bacterial counts were not related with any manufacturer, year of production, pH, or EO concentration. Furthermore, a cold storage was not sufficient to insure stability. Most of the CFU counts were close to the cell

counts. The slope of the linear regression curve between CFU counts and cell counts was 1.04, which was not significantly different from 1 ($P > 0.05$). In sample #8.1 stored at 5 °C, one of the few with cell counts markedly higher than CFU counts, a Live/Dead® BacLight viability kit assay (Molecular probes, Eugene, USA) showed that most cells were not viable. As consequence the major part of viable micro-organisms present in hydrosols were likely in a culturable state.

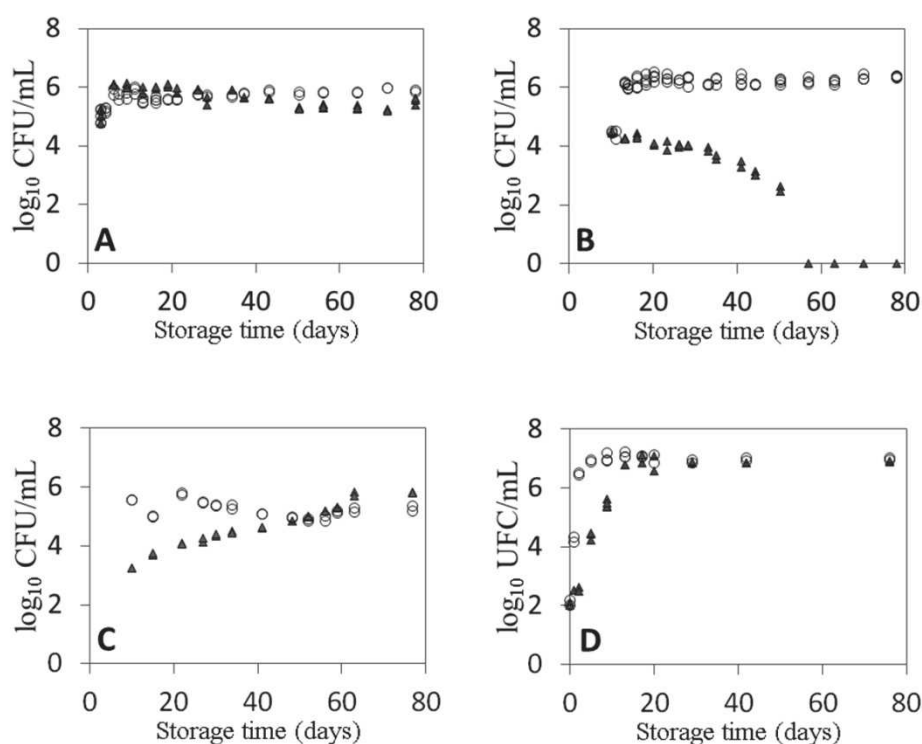


Figure 38 Changes in bacterial counts at 5°C (▲) and 20°C (○) in orange blossom (*Citrus aurantium*) (A, B) and rose C. (*Rosa centifolia*) (C, D) in hydrosols from different origins and/or year of production. Three microbiological counts have been performed at each sampling date and each was represented by a dot. Figure 38A Hydrosols #7.1 and #7.2.; Figure 38B Hydrosols #8.1 and #8.2; Figure 38C Hydrosols #18.1 and #18.2; Figure 38D Hydrosols #22.1 and #22.2

Bacteria identification and phylogeny

Only bacteria were detected in the tested hydrosols, either spread onto DPCA or YGC agar. In total, 71 bacteria strains have been isolated from hydrosols. A molecular typing (M13-PCR) on 40 strains permitted to eliminate 13 clones among isolates. In this way, we isolated 58 representative strains. All of them were Gram-negative species, known as environmental contaminants (Elomari, Coroler *et al.* 1996; Park, Lee *et al.* 2005; Lou, Zhang *et al.* 2007), and belonged to a limited number of genera (Tableau 14). Phylogeny based on *rrs* genes showed an arrangement of the strains in four major branches: a *Pseudomonas sp.* branch, a *Burkholderia cepacia* complex branch, and two branches organized around undefined

species belonging to *Rhodospirillaceae* and *Acetobacteraceae* (Figure 40: Supplementary data S1). The whole *rrs* genes of these two presumed new species are available under the accession numbers LN831188 and LN831189, respectively, in the European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>). Highly distant bacterial species were able to multiply in hydrosols. Many of them are described as acido-tolerant (Stopnisek, Bodenhausen *et al.* 2014) and are therefore rather adapted to survival and growth at the range of pHs of hydrosols (as low as 4.0 in some samples). They seem highly associated to hydrosols. For example *P. veronii* was isolated from hydrosols of different types and different areas and year of production (Tableau 14). *Pseudomonas* and *Burkholderia* species represent 39 out of the 58 hydrosol isolates. These species require low nutrients for growth, and are largely represented in water isolates (Elomari, Coroler *et al.* 1996; Vanlaere, Baldwin *et al.* 2009). *Novosphingobium capsulatum* isolated in a sample of orange blossom hydrosol has been first isolated from distilled water. Its colonies are yellow or whitish-brown (Leifson 1962; Takeuchi, Hamana *et al.* 2001) and this could be in agreement with the yellow to brown sediment observed in contaminated orange blossom hydrosol containers (unpublished data). Neither yeast nor mold was detected in the studied hydrosols. Conditions of hydrosol production are very variable, but production in small units, filling of storage containers in the open air, and unhygienic practices are less than uncommon (Watt 2015) and are the cause of contamination by the environmental bacteria identified in this work.

Impact of bacteria on volatile compounds

The analyses of EO composition of hydrosols during shelf life showed that the volatile profile may change with time. For example, rose C. hydrosols in which *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia diffusa*, and *Janthinobacterium lividum* were the most common isolates (#18), or not contaminated (#17) (Tableau 13 and 14), stored at 5 °C as well as ambient temperature, kept the same volatile profile during at least six months of storage. In contrast pronounced changes were observed in the orange blossom hydrosol #8.2 stored at 20 °C dominantly contaminated by *Burkholderia vietnamiensis* and *Novosphingobium capsulatum*, in which linalool and geraniol concentrations markedly decreased (respectively from 343 mg/L to 146 mg/L and from 61 mg/L to 2.2 mg/L) and concomitantly 6-methyl-5-hepten-2-one concentration increased from 1.3 mg/L to 128 mg/L.

Analysis of the EO composition of rose C. and orange blossom hydrosols (Figure 39), after inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* (strain IA_FO_28), at final bacteria concentrations of respectively 8.0 (± 0.1) log₁₀ CFU/mL and 7.0 (± 0.2) log₁₀ CFU/mL, showed that this species was able (i) to metabolize geraniol and to synthesize citronellol and geranic

acid in the rose C. hydrosol and (ii), to convert geraniol and phenylethyl acetate into respectively geranic acid and 2-phenylethanol in the orange blossom hydrosol (difference between sterile control and inoculated samples significant at $P < 0.01$). Similarly, *Novosphingobium capsulatum* (strain IA_FO_33), at final bacteria concentrations of respectively $7.0 (\pm 0.1) \log_{10}$ CFU/mL and $6.6 (\pm 0.04) \log_{10}$ CFU/mL, was able (i) to convert geraniol into 6-methyl-5-hepten-2-one in both hydrosols, (ii) to convert citronellol into citronellic acid in the sterile rose C. hydrosol, and (iii) to metabolize α -terpineol, methyl anthranilate and phenylethyl acetate which was finally converted into 2-phenylethanol in the orange blossom hydrosol (difference between sterile control and inoculated samples significant at $P < 0.01$). Metabolization of terpenoids by micro-organisms follows different pathways (Demyttenaere 2001; Marmulla and Harder 2014). For example *Pseudomonas putida*, thanks to a plasmid, and *Penicillium digitatum* convert geraniol into 6-methyl-5-hepten-2-one (Vandenbergh 1989; Wolken and van der Werf 2001). Moreover *P. putida* can use geraniol (or citronellol) as sole carbon source (Vandenbergh and Wright 1983; Vandenbergh and Cole 1986). Similarly the bacterium *Castellaniella defragrans* converts geraniol into geranic acid using a geraniol and geranial dehydrogenase, with a gain of two NADH molecules (Lüddeke, Wülfing *et al.* 2012). *P. aeruginosa* converts citronellol into citronellic acid by successive enzymatic reactions involving the geraniol dehydrogenase and the citronellal dehydrogenase (Förster-Fromme, Höschle *et al.* 2006). Further research would be necessary to identify such enzymatic activities in those strains *N. capsulatum* and *Bu. vietnamiensis* representative of the hydrosol microbiota.

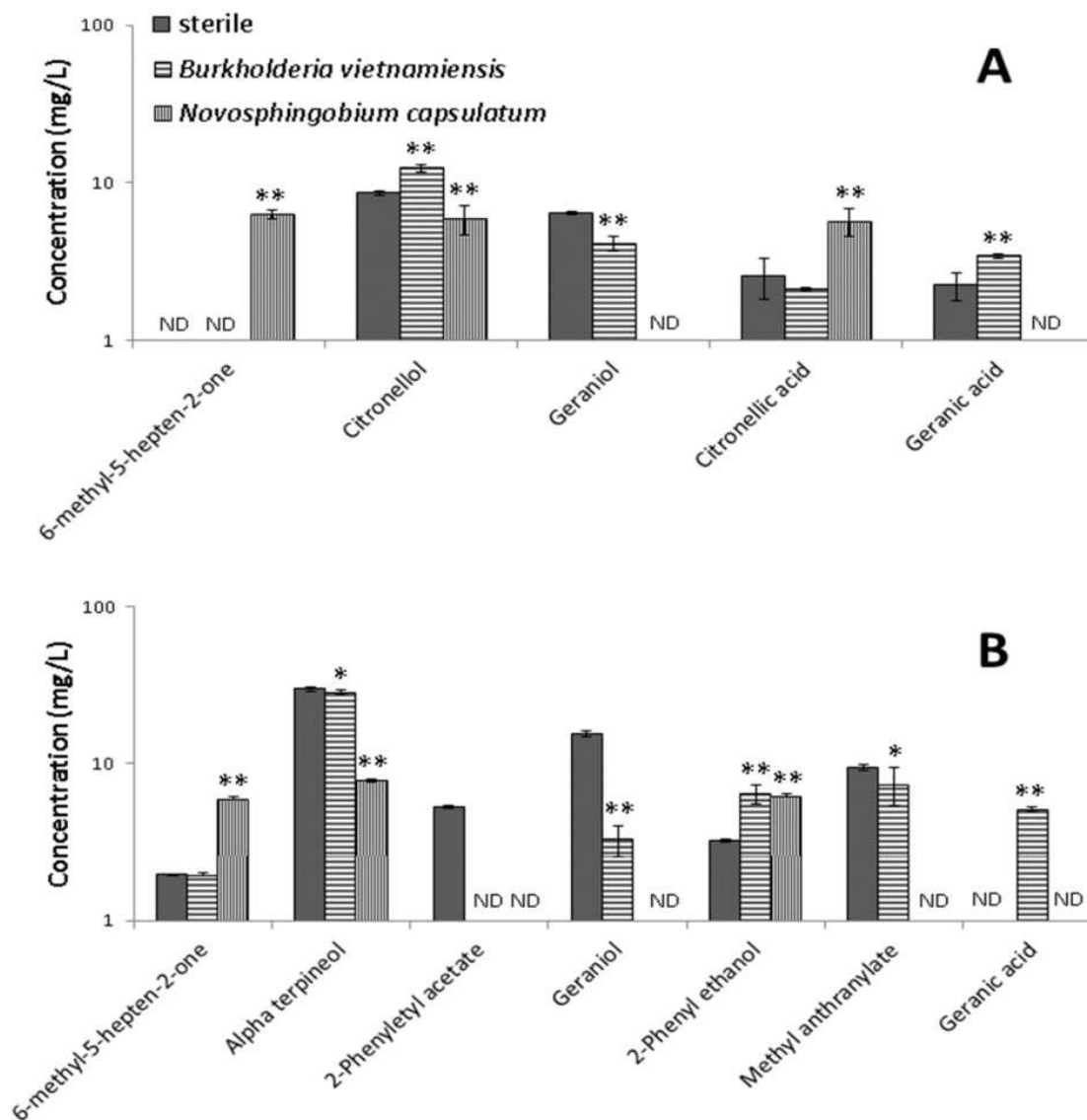


Figure 39 Impact of *Bu. vietnamiensis* and *N. capsulatum* on aromatic compounds in *Rosa centifolia* (A) and *Citrus aurantium* (B) hydrosols after 10 days of incubation.

Full grey: sterile hydrosol; Horizontal stripes: hydrosol inoculated with *Burkholderia vietnamiensis* strain IA_FO_28; Vertical stripes, hydrosol inoculated with *Novosphingobium capsulatum* strain IA_FO_33. ND: Not detected, concentration lower than the detection threshold limit (about 1 mg/L). Errors bars surrounding mean values represent sd (n=3). ** (*) indicates a significant difference between the sterile control and the hydrosol inoculated with each strain at $P < 0.01$ ($P < 0.05$) (Mann-Whitney test).

Tableau 14: Identification of hydrosol bacteria.

Hydrosol	Identification	Identity (%) on NCBI ^a	Number of isolates ^b	Representative strain	Sample # ^c	Storage temperature (°C)	Manu- -facturer	Year	Production country
Citrus aurantium (orange blossom)	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_FO_02 ^d	2	ND	B	2013	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_FO_03 ^d	2	ND	B	2013	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_FO_04 ^d	2	ND	B	2013	France
	<i>Pseudomonas panacis</i>	99	1	IA_FO_19 ^d	6.1	5	B	2014	France
	<i>Pseudomonas panacis</i>	99	1	IA_FO_16 ^d	6.2	20	B	2014	France
	<i>Pseudomonas panacis</i>	99	1	IA_FO_20 ^d	6.1	5	B	2014	France
	<i>Pseudomonas cedrina</i>	99	1	IA_FO_01	2	ND	B	2013	France
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	99	1	IA_FO_09 ^d	3	ND	C	2013	Tunisia
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	99	3	IA_FO_21 ^d	7.1	5	D	2014	Tunisia
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	99	3	IA_FO_28 ^d	8.2	20	E	2014	Tunisia
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	99	1	IA_FO_29 ^d	8.1	5	E	2014	Tunisia
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	99	1	IA_FO_31 ^d	8.1	5	E	2014	Tunisia
	<i>Burkholderia lata</i>	100	1	IA_FO_15 ^d	6.2	20	B	2014	France
	<i>Burkholderia lata</i>	99	1	IA_FO_23 ^d	7.1	5	D	2014	Tunisia
	<i>Burkholderia lata</i>	99	1	IA_FO_26 ^d	7.2	20	D	2014	Tunisia
	<i>Burkholderia lata</i>	99	1	IA_FO_34 ^d	10	ambient	D	2014	Tunisia
	<i>Burkholderia arboris</i>	99	1	IA_FO_07	3	ND	C	2013	Tunisia
	<i>Burkholderia ambifaria</i>	99	1	IA_FO_08 ^d	3	ND	C	2013	Tunisia
	<i>Azospirillum amazonense</i>	95	1	IA_FO_05 ^e	0	ND	D	2012	Tunisia
	<i>Azospirillum amazonense</i>	95	1	IA_FO_12 ^e	1	ND	A	2013	Tunisia
	<i>Azospirillum amazonense</i>	96	1	IA_FO_10 ^e	4	ambient	D	2013	Tunisia
	<i>Azospirillum amazonense</i>	95	1	IA_FO_18 ^e	5	ND	A	2013	Tunisia
	<i>Azospirillum amazonense</i>	95	1	IA_FO_22 ^e	7.1	5	D	2014	Tunisia
	<i>Azospirillum amazonense</i>	95	1	IA_FO_25 ^e	7.2	20	D	2014	Tunisia
	<i>Acidomonas methanolica</i>	97	1	IA_FO_13 ^f	1	ND	A	2013	Tunisia
	<i>Acidomonas methanolica</i>	96	1	IA_FO_11 ^f	4	ambient	D	2013	Tunisia
	<i>Acidomonas methanolica</i>	95	1	IA_FO_17 ^f	5	ND	A	2013	Tunisia
	<i>Novosphingobium capsulatum</i>	99	1	IA_FO_33	8.2	20	E	2014	Tunisia
<i>Enterobacter cloacae</i>	99	1	IA_FO_06	3	ND	C	2013	Tunisia	
Rosa damascena (rose D.)	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	2	IA_RD_06 ^d	15	ND	J	2013	Turkey
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_RD_07 ^d	15	ND	J	2013	Turkey
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_RD_01 ^d	16	ND	K	2013	Bulgaria
	<i>Acidomonas methanolica</i>	97	1	IA_RD_04 ^f	14	ND	I	2013	Morocco
	<i>Achromobacter sp.</i>	100	1	IA_RD_02	14	ND	I	2013	Morocco
	<i>Gluconacetobacter sp.</i>	100	1	IA_RD_03	14	ND	I	2013	Morocco
Rosa centifolia (rose C.)	<i>Pseudomonas protegens</i>	99	2	IA_RC_09	18.1	5	B	2013	France
	<i>Pseudomonas protegens</i>	100	1	IA_RC_10	18.2	20	B	2013	France
	<i>Pseudomonas protegens</i>	99	1	IA_RC_04	19	ND	B	2012	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	2	IA_RC_11 ^d	18.1	5	B	2013	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	2	IA_RC_01 ^d	19	ND	B	2012	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_RC_05 ^d	19	ND	B	2012	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	3	IA_RC_22 ^d	22.1	5	B	2014	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_RC_32 ^d	22.2	20	B	2014	France
	<i>Pseudomonas veronii</i>	99	1	IA_RC_40 ^d	22.2	20	B	2014	France
	<i>Pseudomonas panacis</i>	99	1	IA_RC_12 ^d	18.1	5	B	2013	France
	<i>Pseudomonas panacis</i>	99	2	IA_RC_13 ^d	18.1	5	B	2013	France
	<i>Pseudomonas panacis</i>	99	1	IA_RC_34 ^d	22.2	20	B	2014	France
	<i>Burkholderia lata</i>	99	1	IA_RC_17 ^d	18.2	20	B	2013	France
	<i>Burkholderia lata</i>	99	1	IA_RC_18 ^d	18.2	20	B	2013	France
	<i>Burkholderia lata</i>	99	1	IA_RC_24 ^d	22.1	5	B	2014	France
	<i>Burkholderia lata</i>	99	2	IA_RC_30 ^d	22.2	20	B	2014	France
	<i>Burkholderia lata</i>	99	1	IA_RC_39 ^d	22.2	20	B	2014	France
	<i>Burkholderia diffusa</i>	99	1	IA_RC_16	18.2	20	B	2013	France
	<i>Azospirillum amazonense</i>	96	1	IA_RC_03 ^e	19	ND	B	2012	France
	<i>Acidovorax wautersii</i>	99	1	IA_RC_06	20	ND	B	2012	France
	<i>Sphingobium baderi</i>	98	1	IA_RC_07	20	ND	B	2012	France
<i>Janthinobacterium lividum</i>	100	2	IA_RC_14	18.1	5	B	2013	France	
<i>Delftia acidovorans</i>	99	1	IA_RC_08	20	ND	B	2012	France	

^a *rrs* gene sequence identity

^b number of clonal isolates pointed out by molecular typing (M13-PCR)

^c same as Tableau 11

^d species subjected to phenotypic tests for identification

^e presumed new specie (accession number LN831188)

^f presumed new specie (accession number LN831189); ND: Not determined

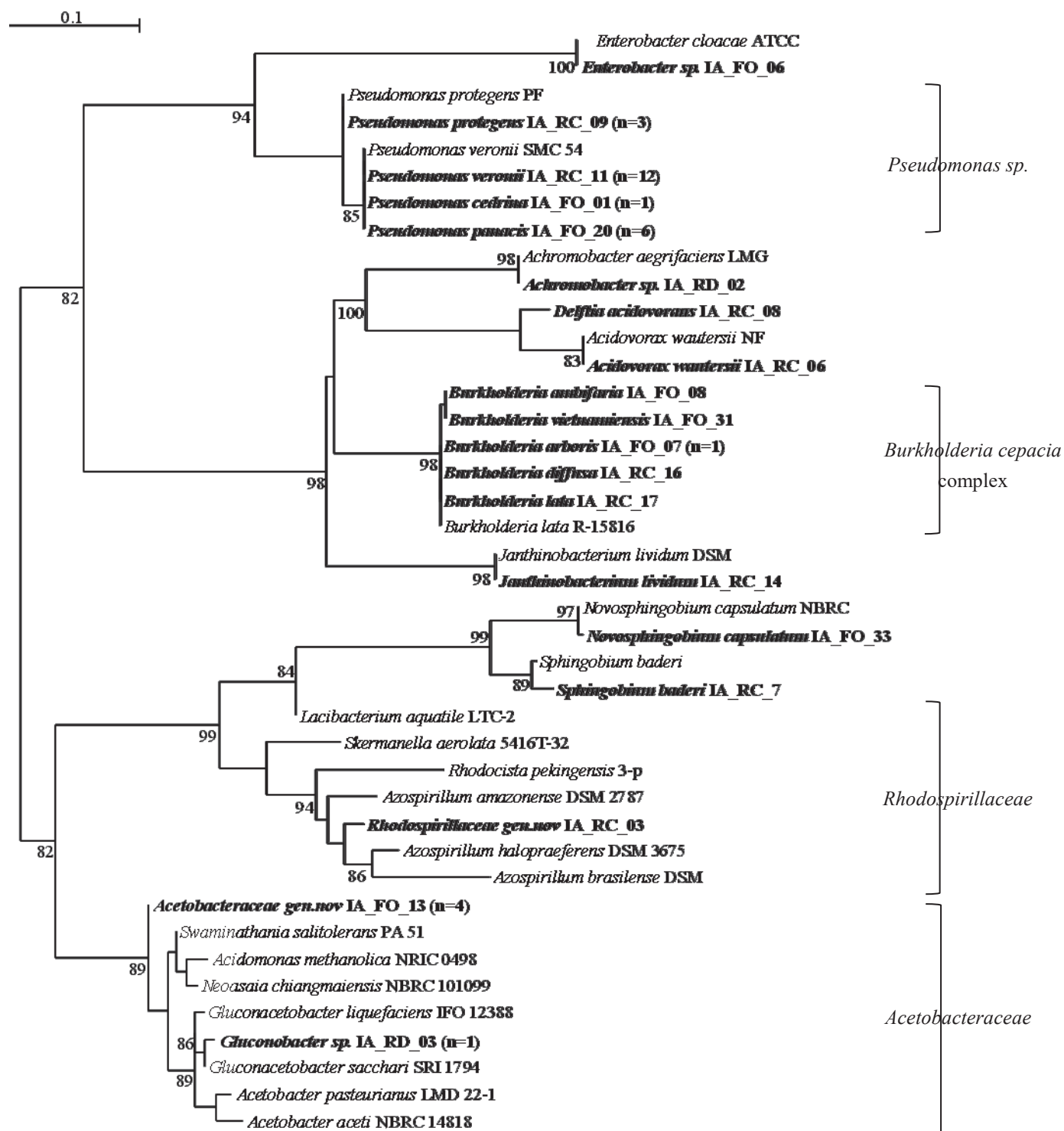


Figure 40 Supplementary data S1: Maximum likelihood phylogenetic tree based on rrs gene sequences of all representative species from hydrosols. The phylogenetic positions of 19 representative isolates (17 identified species and two unidentified species *Acetobacteraceae gen.nov.* (LN831189) and *Rhodospirillaceae gen. nov.* (LN831188) are indicated in boldface and are shown among a selection of 22 representative reference strains (type-strains) in the families Rhodospirillales, Pseudomonadales and Burkholderiales. The number of isolates isolated from hydrosols for each species is noticed within parentheses (n). Values of node supports above 80% are given at each branch point.

Conclusion

Hydrosols of orange blossom, rose C., and rose D harbors a heterogeneous microbiota able to proliferate to relatively high numbers (up to 10^6 – 10^7 CFU/ml) despite the presence of EOs. Some of the strains contaminating hydrosols during process operations have an impact on volatile profile. The production of 6-methyl-5-hepten-2-one in hydrosols was specific to the presence of *Novosphingobium capsulatum* and could be used as a chemical marker for such contamination. All the identified bacterial contaminants could be eliminated by pasteurization (no spore-forming bacteria identified), but with a possible alteration of the aromatic profile (Baydar, Kuleasan *et al.* 2013). In absence of an aseptic packaging at the end of the distillation line and/or filtration, and because of the relative inefficiency of long term storage at low temperature, stability has to be obtained with chemical preservatives, which must comply with sanitary rules and also keep the physical, chemical and delicate sensory quality of the products.

Acknowledgments

This work is a partial fulfillment of Cécile Labadie's PhD thesis, who has received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France. Thanks are due to Odile Berge (INRA, *Centre de Recherche PACA*) and Nicolas Baldovini (*Université de Nice Sophia Antipolis*) for helpful scientific discussions and to Stéphanie Oriol and Sabine Malléa for assistance in microbiological analysis.

5.1.3. Résultats complémentaires : suivi d'une troisième campagne de production d'eau de rose de mai

L'eau de rose de mai a également été prélevée dans un contenant stérile lors d'une troisième campagne de production, en mai 2015, cette fois-ci dans la cuve de transfert dès la fin de la distillation, et non en sortie d'essencier comme lors des campagnes précédentes. Une partie de cette eau a été stockée à température ambiante (environ 21°C) et une autre partie a été stockée en chambre froide à 5°C.

La première analyse microbiologique a eu lieu 5 heures après la fin de la distillation. Figure 41, on remarque que la population initiale (T+5h) est 3,3 log₁₀ UFC/mL. La population de l'eau de rose de mai stockée à température ambiante augmente ensuite rapidement, en 6 jours, jusqu'à la population maximale de 5,5 log₁₀ UFC/mL. L'échantillon ayant été stocké en chambre froide à 5°C montre une décroissance progressive de la population bactérienne jusqu'à une population bactérienne mésophile totale inférieure au seuil de détection soit <0,4 log₁₀ UFC/mL. On peut donc conclure ici que la contamination bactérienne peut subvenir dès la cuve de transfert, et qu'un stockage au froid a permis de stabiliser cette eau florale.

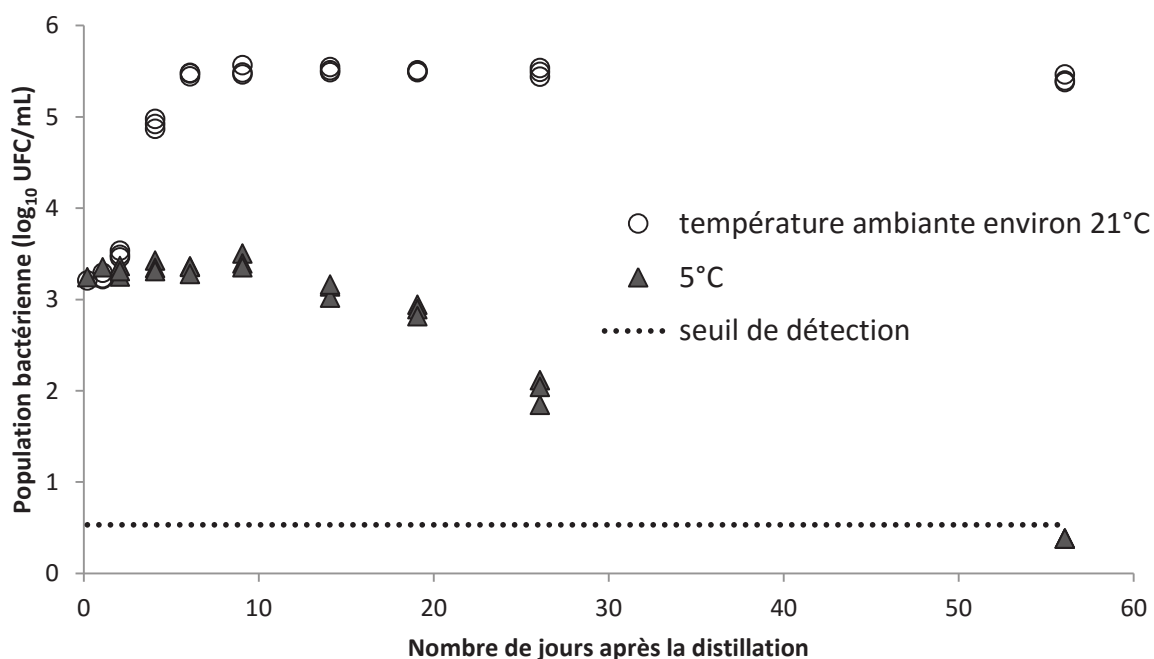


Figure 41 Evolution de la population bactérienne en fonction du temps de stockage de l'eau de rose de mai prélevée dans la cuve de transfert lors d'une troisième campagne de production. Pointillés : seuil de détection.

5.1.4. Production et métabolisation des composés non volatils par les bactéries

Pour aller plus loin, nous avons voulu connaître l'impact des bactéries sur les composés non-volatils des hydrolats, ainsi que les métabolites produits.

Pour cela, nous avons analysé la fraction non-volatile d'hydrolats fraîchement distillés, dont une partie a été filtrée sur filtre 0,22 µm dès la réception des échantillons au laboratoire et conservée dans les mêmes conditions de température que le même hydrolat ayant subi une contamination naturelle. Tous les échantillons ont été lyophilisés afin d'éliminer la totalité de la fraction volatile et l'eau, et ainsi concentrer la fraction non-volatile. Ils ont été analysés le même jour, et leur population bactérienne a été vérifiée. L'eau de fleur d'oranger analysée correspond à l'échantillon #8.2 (Tableau 11) en milieu de phase exponentielle et en phase stationnaire ; et l'eau de rose de mai correspond à l'échantillon #18.2 en phase de latence et après contamination en phase stationnaire.

5.1.4.1. Eau de fleur d'oranger

L'eau de fleur d'oranger la moins contaminée présentait une population bactérienne de $3,8 \log_{10}$ UFC/mL lors de sa réception au laboratoire et avant sa filtration, et une population maximale de $6,4 \log_{10}$ UFC/mL en phase stationnaire. La population majoritaire présente dans l'échantillon contaminé était composée de *Bu. vietnamiensis* et *Novosphingobium capsulatum*.

On remarque une différence dans la concentration en composés non-volatils entre le milieu de la phase exponentielle et la phase stationnaire (tableau 15), avec une concentration totale qui passe respectivement de 1,7 mg/L à 5,7 mg/L (en équivalent acide succinique). Les microorganismes seraient ainsi capables de convertir de nombreux composés non volatils, dont la plupart restent non-identifiés, ainsi que de l'acide 2-furancarboxylique, quelques acides aminés (alanine et isoleucine), et du 2,3 butanediol. Des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* seraient capables de métaboliser l'acide 2-furancarboxylique en acide glutamique (Kakinuma and Yamatodani 1964; Nichols and Mertens 2008). L'apparition de diosides et de fucose dans l'eau florale contaminée pourrait être liée à la dégradation d'un polyside par les bactéries.

Tableau 15 Concentration en composés et métabolites non-volatils, métabolisés ou produits par les microorganismes présents dans l'eau de fleur d'oranger (n=8).

Eau de fleur d'oranger	Moyennes ($\mu\text{g/L}$) en équivalent acide succinique		Différence ($\mu\text{g/L}$)
	Echantillon filtré dès réception	Echantillon contaminé (φ stationnaire)	
Composé non identifié	28 (\pm 16)	1472 (\pm 33)	1444
Composé non identifié	108 (\pm 10)	1051 (\pm 33)	943
Acide 2-furancarboxylique	169 (\pm 5)	975 (\pm 15)	806
Composé non identifié	26 (\pm 3)	697 (\pm 15)	671
Composé non identifié	7 (\pm 13)	486 (\pm 10)	479
Composé non identifié	50 (\pm 5)	307 (\pm 20)	257
Composé non identifié	162 (\pm 20)	396 (\pm 11)	234
(4-Hydroxy-3-méthoxyphenyl)éthylène glycol	225 (\pm 9)	432 (\pm 9)	207
Composé non identifié	416 (\pm 11)	608 (\pm 16)	192
Acide hydroxyisovalérique	ND	127 (\pm 3)	127
Fucose	7 (\pm 9)	114 (\pm 6)	107
Diéthyléthanamine	104 (\pm 23)	145 (\pm 15)	41
Dioside	36 (\pm 20)	63 (\pm 8)	26
2,3-butanediol	57 (\pm 12)	79 (\pm 9)	22
Alanine	9 (\pm 13)	28 (\pm 7)	19
Isoleucine	ND	18 (\pm 2)	18
Morpholine	8 (\pm 15)	11 (\pm 15)	2
Valine	5 (\pm 10)	3 (\pm 4)	-2
Acide glutamique	9 (\pm 26)	7 (\pm 6)	-3
Composé non identifié	53 (\pm 2)	48 (\pm 2)	-5
Phénylalanine	17 (\pm 13)	8 (\pm 13)	-9
Oxyde de linalol	46 (\pm 6)	21 (\pm 10)	-25
Lysine	41 (\pm 4)	11 (\pm 4)	-30
Acide lactique	167 (\pm 17)	92 (\pm 4)	-76
Acide phénylacétique	174 (\pm 6)	90 (\pm 14)	-85
Acide glycolique	213 (\pm 8)	46 (\pm 1)	-168
Acide hydroxybutyrique	225 (\pm 12)	14 (\pm 1)	-211
Glycérol	363 (\pm 25)	52 (\pm 6)	-311
Alpha terpinéol	794 (\pm 47)	51 (\pm 2)	-744
Acide benzoïque	1794 (\pm 72)	570 (\pm 34)	-1224
Total	1696 (\pm 34)	5681 (\pm 137)	3985

\pm : écart-type calculé par rapport à la moyenne de n=8 échantillons.

5.1.4.2. Eau de rose de mai

L'eau de rose utilisée pour cette expérience provient d'un échantillon stérile n'ayant jamais été contaminé, et d'un échantillon de la même eau florale ayant été contaminé naturellement, et dont la population majoritaire est composée de *P. protegens* et *Bu. lata* et *Bu. diffusa*.

On remarque tableau 16 l'apparition de nombreux métabolites tels que la L-leucine (acide aminé), l'acide phénylacétique sûrement produit par conversion du phénylacétaldéhyde et/ou du phényléthanol (KEGG 2015), d'autres acides aminés (isoleucine, phénylalanine, lysine, valine, alanine), des diosides sûrement issus de la dégradation de polysides, de l'oxyde de linalol par oxydation du linalol, l'acide glutamique qui pourrait être produit à partir de l' α -cetoglutarate (lui-même étant un métabolite intermédiaire du cycle de Krebs)(KEGG 2015). Ces microorganismes seraient également capables d'utiliser l'acide lactique (Gu, Xu *et al.* 2002) et le glycérol notamment en condition oligotrophes (Nikel, Kim *et al.* 2014).

Tableau 16 Concentration en composés et métabolites non-volatils, métabolisés ou produits par les microorganismes présents dans l'eau de rose de mai (n=8).

Eau de rose de mai	Moyennes ($\mu\text{g/L}$) en équivalent acide succinique		Différence ($\mu\text{g/L}$)
	Echantillon filtré dès réception	Echantillon contaminé (φ stationnaire)	
L-Leucine	ND	1232 (\pm 38)	1232
Composé non identifié	59 (\pm 2)	980 (\pm 24)	921
Acide phénylacétique	8 (\pm 5)	648 (\pm 12)	640
Diéthyléthanamine	24 (\pm 6)	466 (\pm 12)	441
Isoleucine	23 (\pm 3)	217 (\pm 7)	194
Dioside 2	120 (\pm 5)	291 (\pm 10)	171
Alpha-terpinéol	6 (\pm 7)	154 (\pm 5)	148
Phénylalanine	20 (\pm 2)	145 (\pm 8)	125
Lysine	28 (\pm 9)	133 (\pm 14)	105
Valine	32 (\pm 4)	137 (\pm 5)	105
Oxyde de linalol	32 (\pm 3)	113 (\pm 4)	82
Morpholine	9 (\pm 2)	85 (\pm 3)	76
Alanine	27 (\pm 4)	89 (\pm 4)	62
Acide hydroxybutyrique	9 (\pm 2)	68 (\pm 13)	59
Acide glutamique	30 (\pm 2)	80 (\pm 4)	51
Acide 2-furancarboxylic	5 (\pm 5)	46 (\pm 3)	41
Dioside 1	115 (\pm 10)	140 (\pm 58)	25
Composé non identifié	25 (\pm 2)	48 (\pm 2)	24
Composé non identifié	12 (\pm 1)	22 (\pm 3)	10
Composé non identifié	8 (\pm 2)	16 (\pm 1)	8

Fucose	13 (\pm 5)	20 (\pm 6)	7
Composé non identifié	6 (\pm 2)	12 (\pm 6)	6
(4-Hydroxy-3-méthoxyphenyl)éthylène glycol	9 (\pm 2)	10 (\pm 3)	1
Acide hydroxyisovalérique	1 (\pm)	2 (\pm 2)	1
2,3-butanediol	2 (\pm 2)	2 (\pm 1)	0
Composé non identifié	6 (\pm 5)	5 (\pm 6)	-1
Composé non identifié	6 (\pm 2)	4 (\pm 3)	-2
Composé non identifié	61 (\pm 36)	52 (\pm 68)	-8
Acide glycolique	91 (\pm 3)	56 (\pm 3)	-35
Glycérol	188 (\pm 7)	ND	-188
Acide lactique	635 (\pm 13)	314 (\pm 9)	-321

\pm : écart-type calculé par rapport à la moyenne de n=8 échantillons ; ND : non déterminé.

Toutes ces voies métaboliques sont hypothétiques et devraient être vérifiées et confirmées par des analyses complémentaires, telles que l'ajout d'un composé seul dans un milieu de culture pauvre et inoculation par l'une des souches bactériennes isolées des hydrolats, puis extraction, dosage, et identification des métabolites.

L'analyse de ces composés non volatils nécessite une triméthylsilylation des groupements alcool et acide afin de rendre ces composés plus volatils pour leur analyse en chromatographie gazeuse. Cette dérivation complexifie les spectres de masse et les bases de données utilisées pour l'identification (Nist 08 et Wiley 8) sont plus documentées en composés non dérivatisés et ne suffisent pas à déterminer la nature de certains composés présents en relativement grand quantité dans ces échantillons. L'utilisation de la banque de données Golm Metabolome database serait potentiellement plus adaptée à l'identification de ces composés.

L'apparition de métabolites tels que les acides aminés par exemple, pourrait permettre la croissance d'autres microorganismes qui seraient incapables de se développer sans facteur de croissance dans un distillat n'ayant jamais été contaminé. Dans cette étude, ceci a été vérifié dans le cas de *N. capsulatum* dont la croissance a été permise dans l'eau de fleur d'oranger uniquement après ajout de résidus bactériens stérilisés.

5.1.5. Analyse de l'espace de tête (Head space) par chromatographie gazeuse

L'analyse de l'espace de tête (head space) permet de déterminer la présence de composés très volatils non détectés lors de l'analyse des composés volatils en injection liquide car ces composés ont un indice de rétention très faible. Pour cela, nous avons choisi deux échantillons de fleur d'oranger et deux échantillons d'eau de rose, chacun stockés à 5°C et à température ambiante. Tableau 17, on remarque la présence de sulfure de diméthyle en

relativement grande proportion (concentration non déterminée), ainsi que du méthanol et de l'éthanol. Le sulfure de diméthyle possède une forte odeur de chou détectée par l'odorat humain à 0,001 mg/L (Falcu and Malard 2005). La concentration de ce composé décroît avec l'augmentation de la température de stockage. Sa température d'ébullition est de 37,2°C, ce composé subit donc une évaporation. Il pourrait être associé à l'odeur de « bouilli » perçue pendant un certain temps après la distillation (environ 1 mois), et qui disparaît avec le temps. Ce résultat est le fruit d'une seule analyse et nécessite des mises au point complémentaires et des répétitions afin d'effectuer une quantification de ces composés, par étalonnage à l'aide de méthanol deutéré par exemple.

Tableau 17 Analyse de l'espace de tête de deux échantillons d'eau de fleur d'oranger stockés à 5°C (#7.1 et #8.1) et à température ambiante (environ 21°C) (#7.2, et #8.2), et de deux échantillon d'eau de rose de mai stockés à 5°C (#18.1 et #21.1) et à température ambiante (#18.2 et #21.2). Aire des pics chromatographiques (x 10000 uA). (n=1)

Echantillon	# 8,1	# 8,2	#7,1	#7,2	#18,1	#18,2	#21,1	#21,2
Acétaldéhyde	160	21	ND	31	21	18	331	342
Sulfure de diméthyle	541	256	265	165	7	4	377	85
Isobutanol	38	99	22	38	3	6	4	3
Acétone	36	99	22	38	5	6	17	19
Acétate de méthyle	28	24	ND	6	ND	ND	4	6
Acétate d'éthyle	39	34	ND	<10 ⁴	ND	ND	ND	ND
Méthanol	1134	1135	506	628	91	88	199	231
Ethanol	542	399	78	53	18	17	242	276

ND : non détecté

5.1.6. Highlights

5.1.6.1. La composition chimique des hydrolats

- En plus des composés volatils qui leur confèrent leurs propriétés organoleptiques, les hydrolats présentent de traces de composés non-volatils entraînés par effet de primage et de moussage pendant le procédé de distillation.
- Les hydrolats fraîchement distillés présentent des composés très volatils dont la concentration diminue à température ambiante, tel que du sulfure de diméthyle qui possède une odeur de chou.

5.1.6.2. La contamination microbienne des hydrolats

- Tous les échantillons d'hydrolats prélevés pendant leur stockage sont contaminés par des bactéries à des niveaux pouvant atteindre 7 log₁₀ UFC/mL.

- Les populations bactériennes maximales sont atteintes entre 2 jours et 10 jours à température ambiante (environ 21°C), et entre 6 jours et 2 mois à 5°C.
- Les bactéries les plus abondantes qui composent le microbiote des hydrolats sont composées majoritairement de *Pseudomonas* sp. et de *Burkholderia* sp. ainsi que deux nouveaux genres bactériens présumés (gen.nov) appartenant aux familles des *Acetobacteraceae* et *Rhodospirillaceae*.
- Nous n'avons pas identifié de souche de *Pseudomonas aeruginosa*, souche de référence pour l'analyse microbiologique des hydrolats, parmi toutes les souches identifiées.
- Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les espèces bactériennes présentes dans les hydrolats et le type d'hydrolat, le fournisseur, le pays de production, et/ou l'année de production.
- le procédé de distillation élimine la microflore présente initialement dans la cuve de distillation.
- Le stockage en condition non aseptique est responsable des contaminations microbiennes, qui peuvent subvenir dès la fin du procédé de distillation au niveau de la cuve de transfert.
- Lorsqu'une filtration a lieu, celle-ci permet de réduire temporairement la population bactérienne mais ne l'élimine pas totalement, permettant ainsi une nouvelle croissance.
- Un stockage à 5°C ne permet pas d'assurer la stabilité des hydrolats.

5.1.6.3. L'impact des microorganismes

- Ces contaminations n'entraînent pas nécessairement d'apparition de signe de non-conformité (turbidité, changement de couleur et/ou des propriétés organoleptiques).
- Certaines bactéries présentes dans les hydrolats peuvent avoir un impact sur le profil volatil et modifier ainsi leurs propriétés organoleptiques, les rendant non-conformes aux standards de qualité requis.
- Elles peuvent également modifier l'aspect des hydrolats par l'apparition d'amas bactériens (de 10 à 20 µm) de couleur marron foncé, ainsi que d'une légère turbidité (Annexe 1).
- Ces bactéries sont capables de produire des métabolites tels que des acides aminés, pouvant être utilisés comme nutriment par de nouvelles populations bactériennes, et permettant ainsi leur croissance.

5.2. Stabilisation des hydrolats

5.2.1. Comportement et contrôle de bactéries pathogènes et d'altération dans les hydrolats de fleur d'oranger et de rose

5.2.1.1. Objectifs de l'étude

Les composés volatils présents dans les hydrolats sont connus pour avoir des effets antimicrobiens (Burt 2004), mais de nombreux microorganismes peuvent les utiliser comme substrats de croissance (Vandenbergh and Cole 1986). Leurs concentrations ne sont pas suffisantes pour assurer la stabilité microbiologique (Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009). Les hydrolats peuvent être inhalés, ingérés, ou encore appliqués directement sur la peau (comme l'eau de rose par exemple) mais également être utilisés comme additif aromatique dans des produits alimentaires ou cosmétiques. Ces préparations doivent être microbiologiquement stables et doivent répondre à des standards d'hygiène (ANSM 2012). L'ajout de conservateurs est une solution rendue possible par quelques textes réglementaires, et relativement simple à mettre en œuvre en l'absence de conditionnement aseptique pour que les hydrolats puissent respecter les spécifications. Ces conservateurs doivent donc être conformes aux réglementations cosmétiques et/ou agroalimentaires, être adaptés aux microorganismes capables de se développer dans les hydrolats et préserver leurs propriétés organoleptiques. L'objectif de cette étude est tout d'abord d'évaluer le potentiel de croissance de divers microorganismes pathogènes et d'altération dans les hydrolats, puis d'évaluer l'efficacité de conservateurs sélectionnés contre ces microorganismes, en milieu de culture liquide et enfin dans les hydrolats.

5.2.1.2. Stratégie

La capacité de croissance de 23 souches pathogènes et d'altération a été évaluée dans 1 échantillon d'eau de rose (#17, Tableau 11) et 1 échantillon d'eau de fleur d'oranger (#8.1). Il s'agit tout d'abord des deux espèces bactériennes dont la Pharmacopée Européenne impose l'absence dans 1 mL d'hydrolat (*Staphylococcus aureus* CIP 4.83 et *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, CIP 76.110, CIP 82.118, CIP 100720T, and CIP 107832), puis d'autres microorganismes pathogènes contrôlés en industrie agroalimentaire et cosmétique (*Escherichia coli* CIP 54.127, *Listeria monocytogenes* CIP 104794, *Salmonella* Typhimurium CIP 104115, *Bacillus cereus* ATCC 14579, la levure *Candida albicans* ATCC 10231, la moisissure *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404), les bactéries d'altération et pathogènes de plantes (*P. protegens* DSM 19095, *Burkholderia lata* DSM 23089, et *P. syringae* INRA CC1544)

et des souches isolées des hydrolats (Labadie, Ginies *et al.* 2015) (*P. protegens* IA_RC_09; *P. veronii* IA_RC_05; *P. panacis* IA_RC_13 ; *Bu. ambifaria* IA_FO_08; *Bu. lata* IA_RC_17 et IA_FO_15, *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09, et *Novoshingobium capsulatum* IA_FO_33). Les souches isolées d'hydrolats seront également soumises à différentes conditions de température (5°C et température ambiante environ 21°C) et de pH (pH=3,5, 4,0, 4,5, et 5). Les souches capables de se multiplier dans les eaux florales ont ensuite été soumises à des conservateurs sélectionnés pour leurs utilisations dans les produits cosmétiques et/ou agroalimentaires, dans un milieu de culture liquide (tableau 18). Enfin, l'activité antimicrobienne des conservateurs efficaces en milieu de culture liquide a été évaluée dans les hydrolats.

5.2.1.3. Résultats et discussion

❖ Capacité de croissance de bactéries pathogènes et d'altération dans les hydrolats

Parmi les 23 souches testées, toutes les souches du genre *Burkholderia* ont été capables de se développer dans les deux hydrolats à des populations maximales d'environ 6 log₁₀ UFC/mL (figure 42 tableau 19). Dans l'eau de fleur d'oranger, la population bactérienne de toutes les autres souches testées a diminué en dessous du seuil de détection (<0,4 log₁₀ UFC/mL), à l'exception de la souche de *P. protegens* (IA_RC_09) dont la population a atteint 5,2 log₁₀ UFC/mL, et *A. brasiliensis* dont un mycélium a pu être visible après 23 jours d'incubation à 30°C sous agitation 200 rpm. Dans l'eau de rose, 4 souches de *P. aeruginosa* (CIP 76.110 ; CIP 82.118 ; CIP 100720T ; et CIP 107832), et les bactéries du genre *Pseudomonas* et *N. capsulatum* isolées d'hydrolats, ont été capables de se multiplier jusqu'à des populations maximales comprises entre 4 et 6 log₁₀ UFC/mL. *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, et *C. albicans* ont été capables de survivre dans l'eau de rose. Enfin, les populations bactériennes de *St. Aureus*, *Ba. Cereus*, et une souche de *P. aeruginosa* (CIP 103467) ont diminué en dessous du seuil de détection (<0,4 log₁₀ UFC/mL).

Certains hydrolats sont capables d'inhiber la croissance de nombreux microorganismes. On peut par exemple citer les hydrolats d'ail, de thym, de sauge, d'origan, ou encore de sarriette qui présentent une activité antibactérienne contre de nombreux microorganismes, notamment grâce à la présence de carvacrol, de thymol, ou encore de groupements diallyliques (O'Gara, Hill *et al.* 2000; Sagdic and Ozcan 2003; Al-Turki 2007; Chorianopoulos, Giaouris *et al.* 2008). Au contraire, les hydrolats de rose et de *Backhousia citriodora* n'ont pas montré d'activité antimicrobienne (Wilkinson, Hipwell *et al.* 2003; Ulusoy, Bosgelmez-

Tinaz *et al.* 2009). De plus, les composés volatils majoritaires des hydrolats, le linalol, l'alpha terpinéol, le géraniol ainsi que le 2-phényléthanol, présentent des propriétés antimicrobiennes (Corre, Lucchini *et al.* 1990; Cosentino, Tuberoso *et al.* 1999; Burt 2004; Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011; Zhu, Zhou *et al.* 2011), mais à des concentrations supérieures à celles mesurées dans les deux hydrolats utilisés pour cette étude. Il pourrait donc exister un effet de synergie entre les conditions oligotrophes, le bas pH, et les composés volatils de ces eaux florales. Nous pouvons également remarquer que la bactérie *N. capsulatum* n'a pas été capable de se développer dans l'eau de fleur d'oranger stérile, alors que sa croissance a été permise après addition de résidus bactériens (Labadie, Ginies *et al.* 2015). De même, *P. panacis* et *P. veronii* ont été précédemment isolées d'une eau de fleur d'oranger mais n'ont pas été capables de se multiplier dans l'eau de fleur d'oranger stérile. Ceci appuie l'hypothèse que certaines souches bactériennes seraient capables de se développer dans les hydrolats seulement lorsqu'une première contamination a eu lieu, par utilisation des métabolites et résidus bactériens.

Les microorganismes dont la croissance doit être contrôlée sont les bactéries des genres *Burkholderia sp.* et *Pseudomonas sp.*, incluant *P. aeruginosa*.

❖ Effet du pH et de la température sur les souches d'altération isolées d'hydrolats

Le pH des hydrolats est compris entre pH=4 et pH=7 (Labadie, Ginies *et al.* 2015), et les hydrolats sont habituellement stockés en chambre froide (environ 5°C) ou à température ambiante dans un hangar ou en extérieur. Dans cette étude, nous avons pu remarquer que les souches de *Pseudomonas sp.* et de *Burkholderia sp.* isolées d'eaux florales peuvent se développer même à des pH assez bas (dès pH=4) (figure 43), et qu'une température de 5°C ne permet pas d'inhiber la croissance de *Pseudomonas sp.*, mais permet de réduire la population des bactéries du genre *Burkholderia* en dessous du seuil de détection (<0,4 log₁₀ UFC/mL) (tableau 20). La plupart des espèces de *Pseudomonas* sont capables de se multiplier entre 4°C et 45°C, et à des pH supérieurs à 4,5 (Palleroni 2005^a), mais des études ont montré que des bactéries soumises à des environnement stressants, tels que des conditions oligotrophes que l'on retrouve dans les hydrolats, leur permettent de survivre en présence d'acides organiques à pH=4 (Liu, Li *et al.* 2012). La majorité des espèces du genre *Burkholderia sp.* sont capables de se multiplier entre 10°C et 42°C, et dans des pH compris entre pH=3 et pH=8. Ces espèces sont donc adaptées aux conditions rencontrées dans les hydrolats.

❖ Efficacité des différents conservateurs sur les souches capables de se multiplier dans les hydrolats

Dans un milieu de culture liquide

Nous avons testé l'efficacité de 20 conservateurs (tableau 18) sur les souches capables de se multiplier dans les hydrolats (figure 44 tableau 21). Nous pouvons remarquer que les 6 conservateurs autorisés en industrie cosmétique ont été efficaces sur les 7 souches isolées d'hydrolats, aux concentrations maximales recommandées par la réglementation cosmétique dans les produits finis. Dans le cas des 4 souches de *P. aeruginosa*, même si ces conservateurs sont connus pour avoir des activités antimicrobiennes dans les concentrations utilisées (Davidson, Sofos *et al.* 2005; Lundov, Johansen *et al.* 2011; Gutierrez-Larrainzar, Rua *et al.* 2013), on remarque que le 2-phénoxyéthanol et l'Elestab FL 15[®] ne sont pas efficaces sur toutes les souches aux concentrations maximales testées (respectivement 2,5 g/L et 10 g/L). Le seul sel d'acide organique ayant montré une activité antibactérienne contre toutes ces souches est le benzoate de sodium (à pH=5).

Les acides organiques présentent des activités antimicrobiennes sous leur forme non-dissociée, soit lorsque le pH est inférieur ou proche de leur constante de dissociation (pKa) (Krebs, Wiggins *et al.* 1983; Brul and Coote 1999; Beales 2004). Cependant, les bactéries soumises à des conditions oligotrophes sont capables de développer des résistances à d'autres stress, et notamment aux acides organiques (Van Overbeek, Eberl *et al.* 1995; Gu and Mazzola 2001; Liu, Li *et al.* 2012). Il est donc possible que les conditions oligotrophes, précédemment rencontrées par ces bactéries, leur aient permis de développer des résistances aux acides organiques ajoutés.

Les extraits de plantes testés possèdent de nombreux polyphénols connus pour leurs activités antimicrobiennes (Ikigai, Nakae *et al.* 1993; Hatano, Tsugawa *et al.* 2008; Bansal, Choudhary *et al.* 2013; Jeon, Kim *et al.* 2014). Ceux-ci ont été efficaces contre les 7 souches isolées des hydrolats mais pas contre les 4 souches de *P. aeruginosa*. De plus, ces extraits brunissent avec le temps, les rendant incompatibles à leur utilisation dans les hydrolats, et l'addition d'antioxydant (tel que l'acide ascorbique) aurait été nécessaire afin éviter ce problème (Whitaker and Lee 1995).

Dans les hydrolats

Les composés les plus efficaces sur toutes les souches ont ensuite été testés dans les hydrolats, sur un mélange des 7 souches, avec un suivi régulier sur une période de 3 mois (figure 46 et tableau 22).

Nous pouvons voir que le mélange bactérien (les 7 souches isolées d'hydrolats) n'a pas été capable de survivre dans l'eau de fleur d'oranger lors d'un stockage à 5°C pendant 3 mois. Le stockage au froid et les conditions rencontrées dans l'eau de fleur d'oranger ne favorisent donc pas la croissance de ces bactéries. Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides ont été identiques, et sont les mêmes, ou proches de celles rencontrées lors de l'essai en milieu de culture.

5.2.1.4. Conclusion de l'étude

Les deux hydrolats étudiés favorisent la croissance des bactéries appartenant aux genres *Burkholderia* et *Pseudomonas* (incluant *P. aeruginosa*), qui semblent bien adaptées aux conditions oligotrophes et de pH rencontrées dans les hydrolats. D'autres souches, telles que *E. coli*, *Sa. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, et *C. albicans* sont capables de survivre uniquement dans l'eau de rose de mai, et *A. brasiliensis* est capable de se développer dans l'eau de fleur d'oranger. La population bactérienne des autres souches testées a diminué au-delà du seuil de détection ($<0,4 \log_{10}$ UFC/mL). Leur multiplication peut être contrôlée par l'ajout de conservateurs tels que l'alcool benzylique (seul, ou en mélange avec l'acide déhydroacétique comme dans le Cosgard®), le mélange de thiazolinones (exploité dans le produit commercial Microcare® IT/ITO), l'extrait de pépin de pamplemousse liquide (commercialisé sous le nom d'EPP par Aromazone), ainsi que le benzoate de sodium concentré à 2,4 g/L à pH=5 (soit 19,7 mmol/L en forme non dissociée) et l'éthanol absolu concentré à 50 g/L. Les concentrations inhibitrices des produits testés dans les eaux florales sont diminuées lors d'une conservation à 5°C.

Ces travaux sont détaillés dans l'article scientifique présenté ci-après, à soumettre dans le journal : « Journal of Applied Microbiology » (Wiley)

Title

Fate and control of pathogenic and spoilage micro-organisms in orange blossom (*Citrus aurantium*) and rose flower (*Rosa centifolia*) hydrosols.

Authors

Cécile LABADIE ^{a,b,c}, Céline CERUTTI ^a, Frédéric CARLIN ^{b,c,*}

^a Albert Vieille SAS, 06227 Vallauris, France.

^b INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France.

^c Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France.

Full postal and E-mail addresses of authors

Cécile Labadie (cecile.labadie@avignon.inra.fr; ce.labadie@hotmail.com), Céline Cerutti (CCerutti@ALBERTVIEILLE.com).

Albert Vieille SAS, 629 route de Grasse, BP 217 06227, Vallauris, France
UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA Centre de Recherche PACA, 228, Route de l'Aérodrome, CS40509, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France

*Corresponding author

Frédéric CARLIN (frederic.carlin@avignon.inra.fr)

UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA Centre de Recherche PACA, 228, Route de l'Aérodrome, CS40509, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France

Introduction

Hydrosols are products obtained by the hydro-distillation of aromatic herbs and plants and used for their aromatic and flavoring properties in production of foods, cosmetics and perfumes, or in aromatherapy. Orange blossom and rose hydrosols are among the most widely produced and used hydrosols worldwide (Fernandez, André *et al.* 2014). Hydrosols are basically saturated solutions of essential oils (volatile fraction) in water; orange blossom hydrosols usually contain about 500 mg/L of volatile compounds and rose hydrosols (*Rosa centifolia*) about 150 mg/L (Aslam Khan and Shoaib Ur 2005; Jeannot, Chahboun *et al.* 2005; Ellouze, Debbabi *et al.* 2010; Labadie, Ginies *et al.* 2015). Many volatile compounds and essential oils are well known for their antimicrobial properties against a wide range of microorganisms, but they are used as nutrients by some microorganisms. For example, geraniol exhibit antimicrobial activity against *Escherichia coli* with a minimal inhibitory concentration of 500 mg/L (Burt 2004), but *Pseudomonas fluorescens* could utilize linalool as sole carbon source (Vandenbergh and Cole 1986). Concentrations of volatile compounds in hydrosols are not high enough to prevent microbial proliferation, and bacteria concentrations can reach up to 10^6 CFU/mL in both hydrosols (Labadie, Ginies *et al.* 2015). The major bacteria isolated from hydrosols are *Pseudomonas* species, *Burkholderia cepacia* complex species, *Acetobacteraceae* and *Rhodospirillaceae*. These bacteria are adapted to growth in oligotrophic environments and low to neutral pHs (Palleroni 2005^a; Palleroni 2005^b).

Hydrosols can be ingested, inhaled or can get into contact with skin, directly or indirectly as components or ingredients of more complex preparations such as processed foods or skin creams and lotions. These preparations must be microbiologically stable and safe and therefore should comply with microbiological standards. For instance the European pharmacopeia recommends a maximal total aerobic count of 10^2 CFU/mL, and the absence of the human pathogens *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in 1 mL (ANSM 2012). Such microbiological specifications could be achieved by a proper control of aerial contaminations arising during process and sampling operations of hydrosol in the open air. Another option is the addition of chemical preservatives inhibiting the growth of spoilage and pathogenic micro-organisms. The aim of this work was to evaluate the growth potential of a range of bacteria isolated from hydrosols and of pathogenic micro-organisms, then to test the anti-microbial activity in nutrient broth and/or in hydrosols of a range of chemical preservatives authorized for food and cosmetic applications. The possibility of applications to hydrosols preservation and safety will be discussed with respect to the preservation of limpidity, colour and subtle flavor of hydrosols.

Material and methods

Hydrosols composition

Hydrosols are the aqueous phases remaining after separation of the essential oil after the distillation process. Orange blossom hydrosol (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.) used in this study was sampled from a Tunisian manufacturer (Bigaflor, Nabeul, Tunisia). Rose flower hydrosol (*Rosa centifolia* L.) was sampled from a French manufacturer (St Honorat, Pégomas, France). Both were immediately filtered sterilized (on membrane of porosity 0.22 µm) at reception, i.e. immediately and up to 10 days after distillation, in sterile conditions and stored at -20°C until use. Volatile compounds concentrations and compositions were evaluated as described in previous study and hydrosol samples used in this study is orange blossom hydrosol sample number #8.1, and rose flower hydrosol #17 (Labadie, Ginies *et al.* 2015).

Microbial strains

The 23 strains were *Staphylococcus aureus* CIP 4.83 and *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, CIP 76.110, CIP 82.118, CIP 100720T, and CIP 107832 (which absence in 1 mL of hydrosol is required by the European pharmacopeia) ; *Escherichia coli* CIP 54.127 (*Collection de l'Institut Pasteur*, Paris, France), *Listeria monocytogenes* CIP 104794, *Salmonella* Typhimurium CIP 104115, *Bacillus cereus* ATCC 14579 (American Type Culture Collection, Manassas, USA), *Candida albicans* ATCC 10231, and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (strains of pathogens to be controlled in cosmetic and food products); *P. protegens* DSM 19095 (Deutsche Sammlung für Mikororganismen and Zellkulturen , Braunschweig, Germany), *Burkholderia lata* DSM 23089, and *P. syringae* INRA CC1544 (Institut National de la Recherche Agronomique, Avignon, France) (spoilage or plant pathogenic strains close to the species found in the hydrosol microbiota); and *P. protegens* IA_RC_09, *P. veronii* IA_RC_05, *P. panacis* IA_RC_13, *Bu. ambifaria* IA_FO_08, *Bu. lata* IA_RC_17 and IA_FO_15, *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09, and *Novoshingobium capsulatum* IA_FO_33 (hydrosol strains previously isolated from orange blossom and rose hydrosols and identified in our laboratory) (Labadie, Ginies *et al.* 2015).

Media

The media used in this study for microbial subculture, culture and bacterial counts derived from Plate Count Agar (PCA) or Plate count Broth (PCB) containing tryptone (5 g/L in distilled water), autolytic yeast extract (2.5 g/L) (both from Biokar Diagnostic, Beauvais, France), and glucose (1 g/L) (Sigma-Aldrich), and diluted N-times with $5 \leq N \leq 300$ to give PCBN. Plate counts were performed on 10-times diluted PCA (PCA10) (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) supplemented with agar to get a final 12 g/L agar concentration. Then, media had been heat sterilized at 121°C during a 20 min period.

The dry matter content of PCB300 was of the same order of magnitude as the dry matter content of hydrosol, i.e. about 30 mg/L (Labadie *et al.* 2015). Maximal counts of the tested strains were in the range 6.5 - 7.5 \log_{10} UFC/mL. Yeasts and molds were spread onto Yeast Glucose Chloramphenicol agar (YGC) (Biokar diagnostic) for growth and viability measurements.

Inoculation of hydrosols

Each of 23 microbial strains was inoculated into the orange blossom hydrosol (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.) or the rose flower hydrosol (*Rosa centifolia* L.). Each strain was subcultured for 48h at 30°C on PCA10. Colonies were picked and subcultured overnight at 30°C in PCB100 for a better adaptation to oligotrophic conditions found in the hydrosols. After subculture, suspensions were centrifuged at 2000 x g, for 4 min at 4°C. The supernatant was discarded and the bacteria pellet was suspended in sterile demineralized water. Bacterial population of each strain was evaluated using a Malassez counting chamber and an Olympus BX50 phase-contrast microscope at X400 magnification, and diluted in water to get a bacterial suspension of approx. 5.0 \log_{10} cell/mL. Then a 50 μ L of volume this suspension was added to 4.95 mL hydrosol to get a final population of approx. 3.0 \log_{10} CFU/mL in a 5mL volume. Finally, inoculated hydrosols and sterile control were incubated at 30°C under shaking 200 rpm during 144 h. Experiments were carried out from n=3 different subcultures and cultures for each combination strain/hydrosol. Changes in microbial populations with time were evaluated by spreading 100 μ L of appropriate decimal dilutions in water onto PCA10 plates for bacteria, and onto YGC plates for *C. albicans* and *A. brasiliensis*. Colonies on plates were counted after 48h incubation at 30°C.

Fate of hydrosol bacteria in broth at a range of pH and temperature

The viability and growth capacity of the hydrosol strains *P. protegens* (IA_RC_09), *P. veronii* (IA_RC_05), *P. panacis* (IA_RC_05), *Bu. ambifaria* IA_FO_08, *Bu. lata* IA_RC_17, and IA_FO_15, and *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09 at different temperatures and pHs was tested. All pure strains were subcultured on PCA10 plates at 30°C for 48h.

Isolated colonies were picked and subcultured overnight in a 5mL volume of PCB10 for pH growth capacity test, and in PCB300 for temperature viability tests. Bacterial suspensions were centrifuged and the supernatants were discarded. Bacterial pellets were suspended in 5 mL of demineralized sterile water for pH growth capacity, and in PCB300 for temperature viability tests.

For pH growth capacity tests, liquid broth pHs were adjusted at pH=3.5; 4.0; 4.5; and 5.0 with HCl (1M) as previously described (Labadie, Ginies *et al.* 2015) and filter sterilized (0.22 µm). Growth capacity was tested by inoculation of a 50 µL volume of bacterial suspensions previously adjusted to approximately 5 log₁₀ cell/mL in PCB10 using a Malassez cell counting chamber, into a 4.95 mL volume of PCB10. Initial counts were determined by spreading appropriate decimal dilutions of the bacterial suspension onto PCA10 plates. Suspensions were then incubated at 30°C for 12 days under agitation at 200 rpm. The *A*₆₀₀ of each strain was monitored on a spectrophotometer (Helios Epsilon, Thermo electron corporation, Madison, USA). A positive growth was evaluated by the increase of at least 0.01 *A*₆₀₀ units at the end of the incubation period.

The fate of strains at 5°C and 30°C was tested by inoculation of a 50 µL volume of bacterial suspension, previously adjusted to approximately 5 log₁₀ Cell/mL using a Malassez cell counting chamber, in 4.95 mL of PCB300 incubated at 30°C or 5°C until 12 days under agitation 200 rpm. Viability was regularly recorded by spreading 100 µL of appropriate decimal dilutions onto PCA10 plates, incubated 48h at 30°C. All experiments were performed in triplicate, each with a different inoculum.

Effect of preservatives

- ***Selection of preservatives***

Twenty preservatives were tested. All selected antimicrobial and potential antimicrobial compounds were in compliance with cosmetic and/or food European regulation (UE) 1129/2011 and (CE) 1223_2009. The limpidity, color and flavor of hydrosols after addition of

those was also considered (tableau 18). The preservatives used for cosmetics and tested (n=6) were 2-phenoxyethanol (>99%) (Thor Personal Care, Compiègne, France), Microcare[®] IT/ITO (composed of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one 1,125%, 2-methyl-4-isothiazolin-3-one 0,375% and Mg salts 23,0%) (Thor Personal Care, Compiègne, France), Elestab[®] FL15 (composed of chlorphenesin and methylparaben (5 to 10% each)) (Laboratoires Sérobiologiques, Pulnoy, France), Cosgard (composed of Benzyl alcohol, dehydroacetic acid and water) (Aromazone, Paris, France), Benzyl alcohol (>99%) (Sigma-Aldrich), and Grapefruit seed liquid extract (EPP composed of fermentative extract of grape fruit seed added with citric acid, lactic acid, and ascorbic acid) (Aromazone, Paris, France) (tableau 18). The tested organic acids (or their salts) (n = 7) were potassium sorbate (>99.8%) (Brenntag, Chassieu, France), sodium benzoate (Brenntag, Chassieu, France), DL-malic acid (>99%), *trans*-ferulic acid (>99%), citric acid (>99,5%), DL-lactic acid (>85%), and sodium dehydroacetate (>98,0%) (all Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The tested plant extracts (n = 5) were powders of ginseng panax, green tea extracts containing 50% polyphenols or 90% polyphenols according to manufacturer's specification, grapefruit seed extract containing 50% flavonoids, and grape seed extract containing 50% polyphenols, all from Naturex (Avignon, France); Absolute ethanol (>99.8%) and Nisin were from Sigma-Aldrich. Maximal tested concentrations were selected as a function of maximal authorized concentrations, and/or solubility in water and/or respect of limpidity (no coloration, no foaming) (tableau 18). The effects of a mix sodium benzoate and potassium sorbate were also evaluated using both compounds at equal molar proportions of non-dissociated acid form at pH=5.0 (1:1, mol/mol). All preservative solutions were prepared in MilliQ plusTM water (Merck Millipore, Billerica, USA) at twice the final test concentration and kept less than 4 h at 5°C until use. All organic acids were adjusted to pH=5.00 ± 0.04 with 1M HCl solution or 1M NaOH solution and filter sterilized at 0.22 µm. The MIC (Minimal Inhibitory Concentration) was defined as the lowest preservative concentration preventing microbial multiplication, either evaluated by plate count or A₆₀₀ measurements. The MBC (Minimal bactericidal concentration) was defined as the lowest preservative concentration causing a log reduction in bacterial population ≥ 2 log₁₀ cfu/ml.

Tableau 18 Main characteristics of preservatives and plant extracts used in this study

Tested preservatives and potential preservatives	Domains of applications	pH at maximal concentration	Regulation	Maximal recommended use concentration and remarks	Concentrations tested in this study
2-Phenoxyethanol	Cosmetic	6.74	(CE) 1223/2009	10 g/L	0; 0.25; 0.5; 1; 2.5; 10 g/L
Elestab FL 15®	Cosmetic	6.69	(CE) 1223/2009	10 to 40 g/L	0; 0.5; 2.5; 5; 10; 25 g/L
Microcare® IT/ITO (Kathon)	Cosmetic	5.92	(CE) 1223/2009	0.015 to 1 g/L	0; 0.015; 0.2; and 1g/L
Cosgard®	Cosmetic	4.40	(CE) 1223/2009	2 to 10 g/L; yellow at 10 g/L	0; 2; and 5 g/L
Benzyl alcohol	Cosmetic	8.11	(CE) 1223/2009	10 g/L	0; 1; 3; 6; 10 g/L
Grapefruit seed liquid extract® (EPP)	Cosmetic	5,01	manufacturer's specification	6 g/L; strong flavor at 6 g/L	0; 0.03; 0.09; 0.9; 3 g/L
Ethanol	Food	5,01			15.5; 31.3; 62.5; 125 and 250 g/L
Potassium sorbate	Food	5.04 ^a	(UE) 1129/2011	0,30 g/L alone or 0,25 g/L associated to benzoate	0; 0.075; 0.10; 0.15; 0.2; 0.4; 0.8; and 2 g/L
Sodium benzoate	Cosmetic		(CE) 1223/2009	6 g/L	
	Food	5.04 ^a	(UE) 1129/2011	0,15 g/L	0; 0.06; 0.1; 0.15; 0.3; 0.6; 1.2; 2.4; and 4.8 g/L
	Cosmetic		(CE) 1223/2009	25 g/L rinse-off; 5 g/L leave-on product	
Sodium dehydroacetate	Cosmetic	5.01 ^a and 7.76	(CE) 1223/2009	6 g/L ; never to be applied as spray	0; 0.6; 1.5; 3.0; and 6.0 g/L
<i>trans</i> -ferulic acid	Cosmetic	5.04 ^a			0; 0.05; 0.1; 0.25; 0.5; 1 g/L
Citric acid	Food	5.01 ^a	(UE) 1129/2011	<i>Quantum satis</i>	0; 1; and 5 g/L
DL-malic acid	Food	5.02 ^a	(UE) 1129/2011	<i>Quantum satis</i>	0; 1; and 5 g/L
DL-lactic acid	Food	4.97 ^a	(UE) 1129/2011	<i>Quantum satis</i>	0; 0.2; 0.4; 1; 2; and 4 g/L
Nisin	Food	5.68			0; 0.5; and 1 g/L
Ginseng panax		6.96		Foam	0; 0.5; and 10 g/L
Green tea 50%		6.46		Darken with time	0; 0.025; 0.2; 0.4; 0.8; and 1.6 g/L
Green tea 90%		5.90		Darken with time	0; 0.025; 0.2; 0.4; 0.8; and 1.6 g/L
Grapefruit seed		6.58			0; 0.005; 0.05; 0.1; 0.5; and 1 g/L
Grape seed		5.73		clear yellow at 1 g/L	0; 0.005; 0.05; 0.1; 0.5; and 1 g/L

^a Adjusted to pH=5

- **Effects of preservatives on bacteria in nutrient broth**

Assays with the different preservatives was done on strains able to multiply in hydrosols, i.e. hydrosols strains (n = 7) *P. protegens* IA_RC_09, *P. veronii* IA_RC_05, *P. panacis* IA_RC_13, *Bu. ambifaria* IA_FO_08; *Bu. lata* IA_RC_17 and IA_FO_15, and *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09, and *P. aeruginosa* strains (n = 4) CIP 76.110, CIP 82.118, CIP 100720T and CIP 107832. Each strain was subcultured on PCA10 plates and incubated for 48 h at 30°C. A loopful of a colony of each strain was overbight subcultured at 30°C in a 5 mL volume of PCB10 under shaking at 200 rpm. After subculture, the bacteria solutions were centrifuged at 2000 g for 4 min at 4°C, the supernatant was discarded and the bacteria pellet was suspended in a 5 mL volume of PCB5. After vortexing, bacteria concentrations were evaluated using a Malassez counting chamber and an Olympus BX50 phase-contrast microscope at X400 magnification. Bacteria suspensions were then diluted into PCB5. A volume of 125 µL of bacterial suspensions was poured into microplate wells (Greiner Bio-one, Les Ulis, France) and mixed to an equal volume of each preservative solution to get a final bacterial concentration of 6.0 log₁₀ CFU/mL. Initial populations were controlled by spreading the appropriate decimal dilution of bacterial suspensions onto PCA10 plates. Wells containing sterile PCB10 with preservatives and inoculated PCB10 without preservatives were used as control in each microplate. Changes in A₆₀₀ were recorded each 15 min at an incubation temperature of 30°C for 48 h under agitation at 200 rpm using a thermostated plate count reader (Tecan, Männedorf, Suisse).

- **Effect of preservatives in hydrosols**

The fate of the hydrosol strains inoculated in orange blossom and rose hydrosols with preservatives that exhibited inhibitory activity was evaluated. Preservative solutions in 40 mL hydrosol volumes were prepared a few hours before use, filter sterilized (0.22 µm), and 4.95 mL volumes were dispensed into sterile glass tubes. Hydrosols without preservative were used as controls. The seven hydrosol strains were subcultured and cultured as described in section "Inoculation of hydrosols". The bacterial suspensions, approximately concentrated at 5 log₁₀ cell/mL, were then mixed by pouring 200 µL of each bacterial suspension into a 2 mL microtube (StarLab, Hamburg, Germany) and vortexing. Then, 50µL of bacterial mix suspension was poured into 4.95 mL hydrosol to get a final concentration of approx. 3.0 log₁₀ cell/mL in a 5mL volume. The final concentration of pure strains suspensions and bacterial mix suspensions were controlled by spreading 100 µL of the appropriate dilution onto PCA10. The experiments were carried out in triplicate.

Changes in bacterial concentrations with time were performed by sampling 200 µL of the suspension, then spreading 100 µL volumes of the appropriate decimal dilutions on PCA10 plates and counting after 48h incubation at 30°C.

Results and discussion

Hydrosol compositions

The total concentration in volatile compounds of the orange blossom hydrosol was 670 ± 35 mg/L (mean \pm standard deviations on replicate analyses, $n = 2$). The three major compounds were linalool (320 ± 25 mg/L), alpha terpineol (111 ± 6), and geraniol (57 ± 2). Hydrosol pH was 4.0.

The *Rosa centifolia* hydrosol was composed of 103 ± 4.1 mg/L of total volatile compounds. The major volatile compounds were 2-phenylethanol (42 ± 2), citronellol (22 ± 1), geraniol (14 ± 1). Hydrosol pH was 6.9.

Total concentrations and relative concentrations in each compound were within the range of concentrations reported elsewhere for both hydrosols (Aslam Khan and Shoaib Ur 2005; Jeannot, Chahboun *et al.* 2005; Mahboubifar, Shahabipour *et al.* 2014). Orange blossom and rose (*Rosa centifolia*) hydrosols pHs are generally comprised between pH=4 and pH=7, with median pH of 5.2 (Labadie, Ginies *et al.* 2015).

Fate of pathogenic and spoilage-causing micro-organisms in orange blossom and rose hydrosols

All tested *Burkholderia* species (*Bu. ambifaria*, *Bu. lata* and *Bu. vietnamiensis*) were able to multiply in both hydrosols to bacterial concentrations up to $6 \log_{10}$ CFU/mL (Figure 42 and Tableau 19). In orange blossom hydrosol, the cultivable populations of all other tested strains decreased to non-detectable levels ($<0.4 \log_{10}$ CFU/mL), except *P. protegens* (IA_RC_09) that grew up to $5.2 \log_{10}$ CFU/mL and *Aspergillus brasiliensis* which mycelium was visible after 23 days incubation. In rose flower hydrosol (*Rosa centifolia*), 4 strains of *P. aeruginosa* (CIP 76.110; CIP 82.118; CIP 100720T; CIP 107832), *Pseudomonas* species isolated from hydrosols (*P. protegens* IA_RC_09, *P. veronii* IA_RC_05, and *P. panacis* IA_RC_13), and *Novoshingobium capsulatum* (IA_FO_33) were able to multiply to maximal populations comprised between 4 to $6 \log_{10}$ CFU/mL. Counts of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Candida albicans* remained unchanged in rose

hydrosol after 6 days of incubation at 30°C. Counts of *St. aureus*, *Ba. cereus*, and *P. aeruginosa* strain CIP 103467) decreased to non-detectable level (<0.4 log₁₀ CFU/mL).

The ability of hydrosols to support microbial proliferation depends on the hydrosol itself and of the tested micro-organism. Garlic, thyme, and sage hydrosols exhibit inhibitory activity against *Bacillus subtilis* and *Salmonella* Enteritidis (Al-Turki 2007). The application of *Satureja thymbra* hydrosol during 90 min reduced the viability of *Staphylococcus stimulans*, *Pseudomonas putida*, and *Lactobacillus fermentum* biofilms to undetectable counts (Chorianopoulos, Giaouris *et al.* 2008). Hydrosols of thyme, oregano and summer savory (*Lamiaceae* plants) exhibit antibacterial activity against *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*, among other bacteria (Sagdic and Ozcan 2003). The antimicrobial activity of these hydrosols is probably due to the presence of carvacrol and thymol in sage, thyme, satureja, oregano, and summer savory (Chorianopoulos, Giaouris *et al.* 2008) and to the diallyl constituents in garlic oil (O'Gara, Hill *et al.* 2000; Sagdic and Ozcan 2003). In contrast, hydrosols of *Backhousia citriodora* and *Rosa damascena* did not exhibit any antibacterial or antifungal activity (Wilkinson, Hipwell *et al.* 2003; Ulusoy, Bosgelmez-Tinaz *et al.* 2009).

In this study, the orange blossom hydrosol prevented the growth of *E. coli* (CIP 54.127), *St. aureus* (CIP 4.83), all *P. aeruginosa* tested strains (CIP 103467; CIP 76.110; CIP 82.118; CIP 100720T; CIP 107832), *Ba. cereus* (ATCC 14579), *L. monocytogenes* (CIP 104794), *Salmonella* Typhimurium (CIP 104115), *P. syringae* (CC1544), of *P. protegens* (DSM 19095), *P. veronii* (IA_RC_05), *P. panacis* (IA_RC_13), *C. albicans* (ATCC 10231), and *Novosphingobium capsulatum* (IA_FO_33). *N. capsulatum* had been first isolated from orange blossom hydrosol, but fail to grow in sterile hydrosol (never contaminated). In our previous study (Labadie, Ginies *et al.* 2015), the growth of *N. capsulatum* in orange blossom hydrosol was insured by the addition of an amount of sterilized bacteria pellet remaining in contaminated orange blossom hydrosol. *P. veronii* and *P. panacis*, already found in orange blossom hydrosol (Labadie, Ginies *et al.* 2015), cannot survive (counts <0.4 log₁₀ CFU/mL after 48 h incubation at 30°C) in sterile orange blossom hydrosol. This suggests that these strains are able to grow in orange blossom hydrosol only when a previous bacterial population already grown in there, and use bacterial metabolites for growth. Linalool and alpha terpineol, the major compounds in orange blossom hydrosol, exhibit minimal inhibitory concentrations comprised between 200 and 900 mg/L against *E. coli*, *St. aureus*, and *B. cereus* (Cosentino, Tuberoso *et al.* 1999; Ait-Ouazzou, Cherrat *et al.* 2011). In the same way, geraniol exhibits minimal inhibitory concentration ranging from 500 to 1000 mg/L against *E. coli*, *Sa.* Typhimurium, and *L. monocytogenes* (Burt 2004). These literature inhibitory concentrations are higher than concentrations measured in hydrosol. The antimicrobial activity of orange

blossom hydrosol can be due to synergistic effect of oligotrophic conditions, volatile compounds concentrations, and low pH in orange blossom hydrosol.

Rose hydrosol (*Rosa centifolia*) prevented growth of *S. aureus* (CIP 4.83), *Ba. cereus* (ATCC 14579), *P. aeruginosa* (CIP 103467), *P. syringae* (CIP CC1544), and *A. brasiliensis* (ATCC 16404). The major compound, 2-phenylethanol, exhibit inhibitory concentration of 200 mg/L against *E. coli* (Zhu, Zhou *et al.* 2011), and in the range of 2400 to 4800 mg/L against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *St. aureus* (Corre, Lucchini *et al.* 1990). As well as orange blossom hydrosol, the oligotrophic conditions seem to have a synergistic effect with the volatile compounds concentrations against a few bacteria. This hydrosol supported the growth of *Pseudomonas* and *Burkholderia* species.

Burkholderia sp. and *Pseudomonas sp.* were the only tested bacteria which growth had to be controlled.

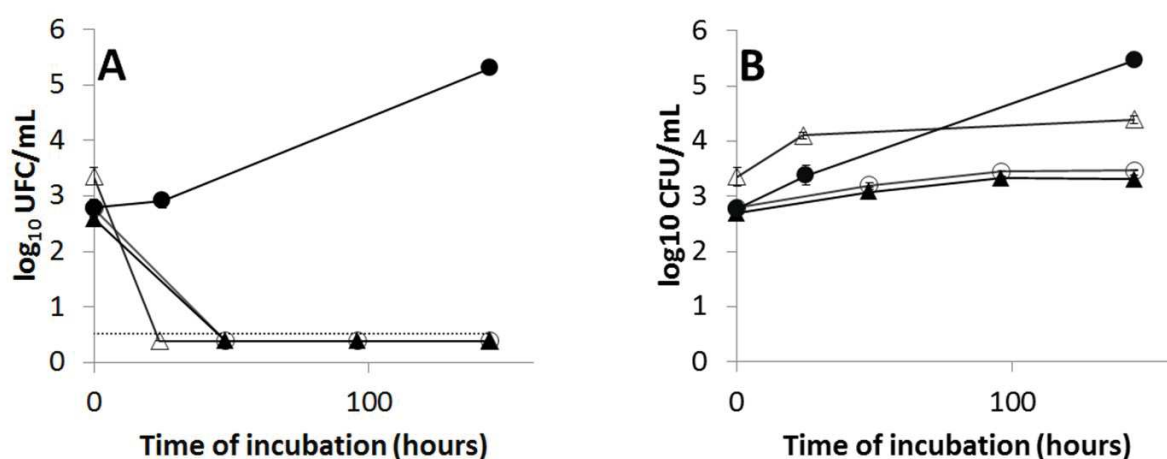


Figure 42 Fate of *Listeria monocytogenes* 1/2a CIP 104794 (○), *Pseudomonas aeruginosa* CIP 100720T (Δ), *Salmonella enterica enterica* Typhimurium CIP 104115 (▲), and *Burkholderia lata* DSM 23089 (●) in orange blossom hydrosol (A) and rose flower hydrosol (B) at 30°C Bars represent standard deviation, (n= 3) and may be hidden by key-symbols when small. Dotted line: detection limit.

Tableau 19 Changes in bacteria populations of reference spoilage and pathogenic bacteria, and of strains isolated from hydrosols after 144h incubation at 30°C in hydrosols. Expressed in log₁₀ (CFU/mL). n=3.

Strain	Increase or reduction in bacterial populations (log ₁₀ CFU/ml) after a 6-day incubation at 30°C in the hydrosol of:	
	Orange blossom	<i>Rosa centifolia</i>
<i>E. coli</i> CIP 54.127	- 1.5 (± 0.5)	+ 0.5 (± 0.4)
<i>S. aureus</i> CIP 4.83	<- 3.5 (± 0.03)	<- 3.5 (± 0.03)
<i>P. aeruginosa</i> CIP 103467	<- 3.1 (± 0.08)	<- 2.9 (± 0.06)
<i>P. aeruginosa</i> CIP 76.110	<- 3.3 (± 0.6)	+ 0.9 (± 0.5)
<i>P. aeruginosa</i> CIP 82.118	<- 3.2 (± 0.8)	+ 1.3 (± 0.7)
<i>P. aeruginosa</i> CIP 100720T	<- 3.4 (± 0.2)	+ 1.0 (± 0.07)
<i>P. aeruginosa</i> CIP 107832	<- 3.2 (± 0.1)	+ 1.6 (± 0.08)
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	<- 3.2 (± 0.09)	<- 3.1 (± 0.06)
<i>L. monocytogenes</i> CIP 104794	<-2.8 (± 0.07)	+ 0.7 (± 0.01)
<i>Salmonella</i> Typhimurium CIP 04115	<-2.6 (± 0.03)	+ 0.6 (± 0.08)
<i>P. syringae</i> CC 1544	<- 2.5 (± 0.4)	<- 2.5 (± 0.4)
<i>P. protegens</i> DSM 19095	<- 2.9 (± 0.03)	+ 3.7 (± 0.1)
<i>Burkholderia lata</i> DSM 23089	+ 2.5 (± 0.2)	+ 2.7 (± 0.1)
<i>P. protegens</i> IA_RC_09	+ 2.2 (± 0.1)	+ 2.2 (± 0.08)
<i>P. veronii</i> IA_RC_05	<- 3.3 (± 0.06)	+ 2.7 (± 0.1)
<i>P. panacis</i> IA_RC_13	<- 3.0 (± 0.05)	+ 1.9 (± 0.2)
<i>B. ambifaria</i> IA_FO_08	+ 3.0 (± 0.06)	+ 2.4 (± 0.02)
<i>B. lata</i> IA_RC_17	+ 2.9 (± 0.2)	+ 2.6 (± 0.1)
<i>B. lata</i> IA_FO_15	+ 2.7 (± 0.02)	+ 2.9 (± 0.06)
<i>B. vietnamiensis</i> IA_FO_09	+ 2.4 (± 0.1)	+ 2.6 (± 0.2)
<i>N. capsulatum</i> IA_FO_33	<- 2.9 (± 0.1)	+ 2.2 (± 0.04)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<- 3.4 (± 0.7)	+ 0.05 (± 0.2)
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	Growth observed after No growth observed a 23-day incubation	

^a Initial population for all strains between 2.5 and 3.5 log₁₀ CFU/mL. Mean ± standard deviation (n=3).

Effect of pH and temperature on the fate of bacteria causing spoilage in hydrosols

Viability conditions were tested on the seven bacterial strains from hydrosols (*P. protegens*, *P. veronii*, and *P. panacis*, *Bu. ambifaria*, 2 strains of *Bu. lata*, and *Bu. vietnamiensis*) (Figure 43 and tableau 20). *Pseudomonas* species showed ability to grow at both tested temperatures (5°C and 30°C), and in pH conditions up to 4.0 but failed to grow at pH=3.5. *Burkholderia* species were able to grow at all tested pH conditions, and 30°C, but viability decreased to undetectable level ($<0.4 \log_{10}$ CFU/mL) when incubated at 5°C.

The pH and temperature can have an influence on microbial growth capacity. Most of the *Pseudomonas* species develop in a range of temperature from 4 to 45°C, and fail to develop in pH lower than 4.5 (Palleroni 2005^a), but for example *Pseudomonas aeruginosa* exposed to antimicrobials at sublethal concentrations showed an ability to tolerate acidic condition and to develop in phosphate buffer at pH=4 in the presence of diverse organic acids (Liu, Li *et al.* 2012). Most of the *Burkholderia* species are able to grow in a range of temperature comprised between 10 to 42 °C and pH comprised between pH=3 and pH=8. (Chen, Chen *et al.* 2003; Lee and Whang 2015). Hydrosols pHs are comprised between pH=4.0 and pH=7.0, all *Burkholderia* and *Pseudomonas* species are likely to multiply at such pHs. A cold storage does not prevent *Pseudomonas sp.* growth but cause a decrease in *Burkholderia sp.* viability. These strains seemed to be well adapted to hydrosol conditions when stored at ambient temperature.

Tableau 20 Changes in bacterial populations of seven hydrosol strains in PCB300 after a 12-day incubation at 5°C and 30°C. mean \pm standard deviation (n=3).

Bacterial strains	Increase or reduction in bacterial counts (\log_{10} cfu/ml) after a 12-day incubation at the indicated temperature	
	5°C	30°C
<i>Pseudomonas protegens</i> (IA_RC_09)	+ 4.5 \pm 0.2)	+ 3.6 \pm 0.06
<i>Pseudomonas veronii</i> (IA_RC_05)	+ 4.5 \pm 0.1	+ 4.1 \pm 0.06
<i>Pseudomonas panacis</i> (IA_RC_13)	+ 4.3 \pm 0.04	+ 4.9 \pm 0.03
<i>Burkholderia ambifaria</i> (IA_FO_08)	<-2.9 \pm 0.1	+ 4.2 \pm 0.01
<i>Burkholderia lata</i> (IA_RC_17)	<-3.1 \pm 0.1	+ 4.3 \pm 0.02
<i>Burkholderia lata</i> (IA_FO_15)	<-3.0 \pm 0.1	+ 4.9 \pm 0.07
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (IA_FO_09)	<-3.0 \pm 0.1	+ 4.2 \pm 0.03

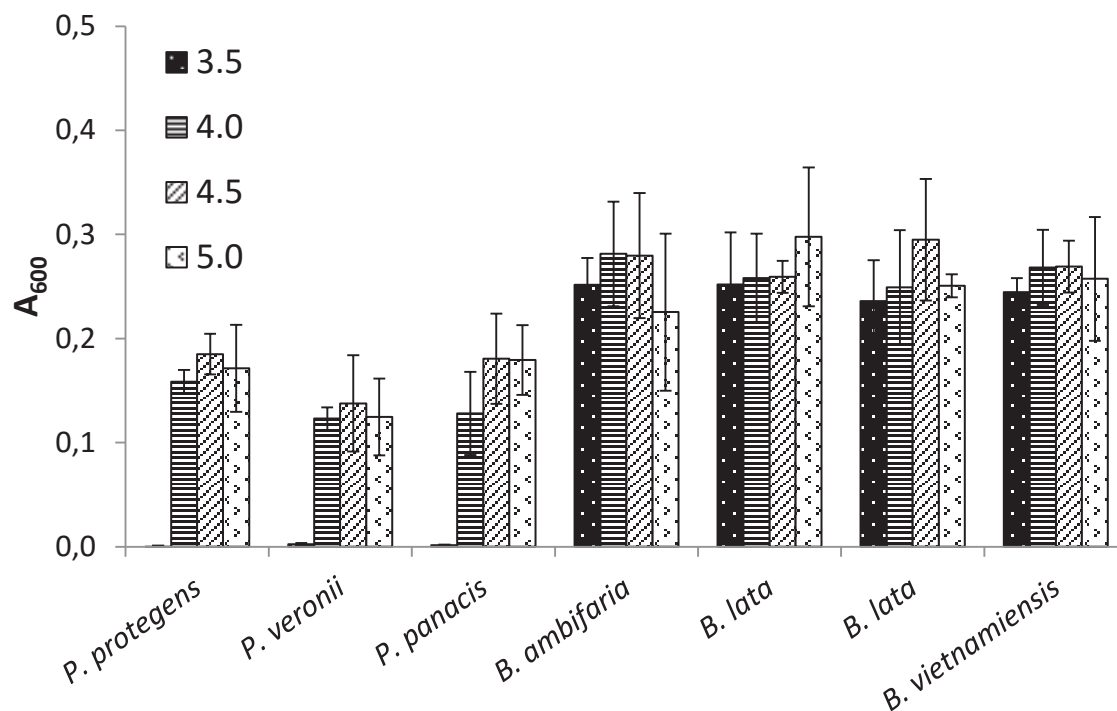


Figure 43 Ability of hydrosol strains to grow in PCB10 medium at different pH after 12 days incubation at 30°C. *P. protegens* IA_RC_09 ; *P. veronii* IA_RC_05 ; *P. panacis* IA_RC_13; *B. ambifaria* IA_FO_08; *B. lata* IA_RC_17; *B. lata* IA_FO_15; *B. vietnamiensis* IA_FO_09.

Efficiency of preservatives on spoilage-causing bacteria and *P. aeruginosa*

- **Ability of a selection of preservative to prevent bacterial growth in liquid medium PCB10**

The growth capacity tests were done on strains that show an ability to grow in hydrosols (Figure 44 and tableau 21). This test showed that the 6 reference preservatives used for cosmetic (2-phenoxyethanol; Microcare[®] IT/ITO; Elestab[®] FL15; Cosgard; Benzyl alcohol; and Grapefruit seed liquid extract (EPP)) and the sodium benzoate prevented bacterial proliferation of all hydrosol strains (*P. protegens*; *P. panacis*; *P. veronii*; *Bu. ambifaria*; the two strains of *Bu. lata*, and *Bu. vietnamiensis*) at the maximal recommended concentrations in cosmetic use. The same compounds tested on the 4 strains of *Pseudomonas aeruginosa* showed that 2-phenoxyethanol and Elestab[®] FL15 did not prevent growth at the maximal tested concentrations, respectively 2.5 g/L and 10 g/L, in contrast with the other compounds. Other weak acids and nisin failed to inhibit bacterial growth. Ethanol inhibited bacterial growth of all tested bacteria when concentrated at 25 g/L (3.2 % vol/vol), except in the case of *P. aeruginosa* strain 100720T where the minimal inhibitory concentration was 50 g/L (6.3 % vol/vol), and these results correspond to the minimal inhibitory concentrations

observed by Chiou *et al.* and Oh *et al.*, comprised between 5 to 7.5 % vol/vol against *L. monocytogenes* and *E. coli* respectively (Oh and Marshall 1993; Chiou, Phillips *et al.* 2004).

Preservatives such as 2-phenoxyethanol, thiazolinones, chlorphenesin, and parabens (present in Microcare[®] IT/ITO and Elestab[®] FL15) show inhibitory concentrations against a wide range of bacteria (Davidson, Sofos *et al.* 2005; Lundov, Johansen *et al.* 2011; Gutierrez-Larrainzar, Rua *et al.* 2013). However bacteria belonging to *Burkholderia cepacia* complex are able to develop adaptive resistance to 2-phenoxyethanol (Rushton, Sass *et al.* 2013). Moreover its capacity to penetrate through human skin together with repeated use could cause health problems like contact allergy, neurologic troubles, and endocrine disruptions (Sun, Lin *et al.* 2006; Lee, An *et al.* 2007; Boberg, Taxvig *et al.* 2010; Scognamiglio, Jones *et al.* 2012; McBride, Baier *et al.* 2014), therefore, they should be used at the lowest needed concentration.

Organics acids in their undissociated form, i.e. at pH lower than pKa, have antimicrobial effect (Krebs, Wiggins *et al.* 1983; Brul and Coote 1999; Beales 2004). But bacteria submitted to starvation, for example in hydrosols conditions, are able to develop various stress resistance, including organic acid resistance (Van Overbeek, Eberl *et al.* 1995; Gu and Mazzola 2001; Liu, Li *et al.* 2012). The hydrosol strains are not impacted by the tested organics acids, except sodium benzoate at pH=5, with MIC ranging from 0.6 to 4.8 g/L depending on the tested strain. Moreover citric acid at pH=5 can be used as nutrient by the tested strains (Figure 44). Sodium benzoate and potassium sorbate are commonly used in combination in cosmetic or food products. They exhibit synergistic action when associated to heat treatment on several yeast strains (Beuchat 1981), but some study show no or a weak synergistic effect of the sorbate potassium and benzoate sodium combination against bacteria (*E. coli*, *St. aureus*, or *P. aeruginosa* for example) and molds (*A. niger* and *Penicillium notatum*) (Stanojevic, Comic *et al.* 2009; Heydarynia, Veissi *et al.* 2011). In this work, we could not see any synergistic effect of sodium benzoate and potassium sorbate combination (Figure 45). Therefore the use of sodium benzoate alone is most effective than the use in combination with potassium sorbate and would be adapted for hydrosol stabilization.

Plant extracts possess a wide range of phenolic compounds that exhibit antibacterial properties, such as epicatechin, epicatechingallate, epigallocatechin, and epigallocatechin-3-gallate (Bansal, Choudhary *et al.* 2013). The MIC of epigallocatechin-3-gallate, the major polyphenol found in green tea, is 64 mg/L against *Staphylococcus aureus* (Hatano, Tsugawa *et al.* 2008), and 573 mg/L against *E.coli* (Ikigai, Nakae *et al.* 1993), and ranging between 200 and 400 mg/L against *P. aeruginosa* (Jeon, Kim *et al.* 2014). Green tea extract exhibit inhibitory activity ranging between 1.25 and 2.5 g/L against *P. aeruginosa* (Jeon, Kim *et al.*

2014). In this study, green tea extracts (50% and 90% polyphenols) showed antibacterial activity against all hydrosols strains, with a MIC ranging from 0.4 to 1.6 g/L, but failed to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* growth (Figure 44 and tableau 21). Moreover, these extracts, when used without antioxidant compound, turn brown with time ($\lambda_{max}=400$ nm and $A_{max}=0.37$), as already reported in food (Whitaker and Lee 1995). None of the plant extracts tested in this work was actually efficient for microbiological stabilization of the hydrosols.

The most efficient preservatives of the seven hydrosol strains and *Pseudomonas aeruginosa* are the cosmetic preservatives (Microcare[®] IT/ITO; Cosgard; Benzyl alcohol; and Grapefruit seed liquid extract (EPP)), ethanol, and sodium benzoate at pH=5.

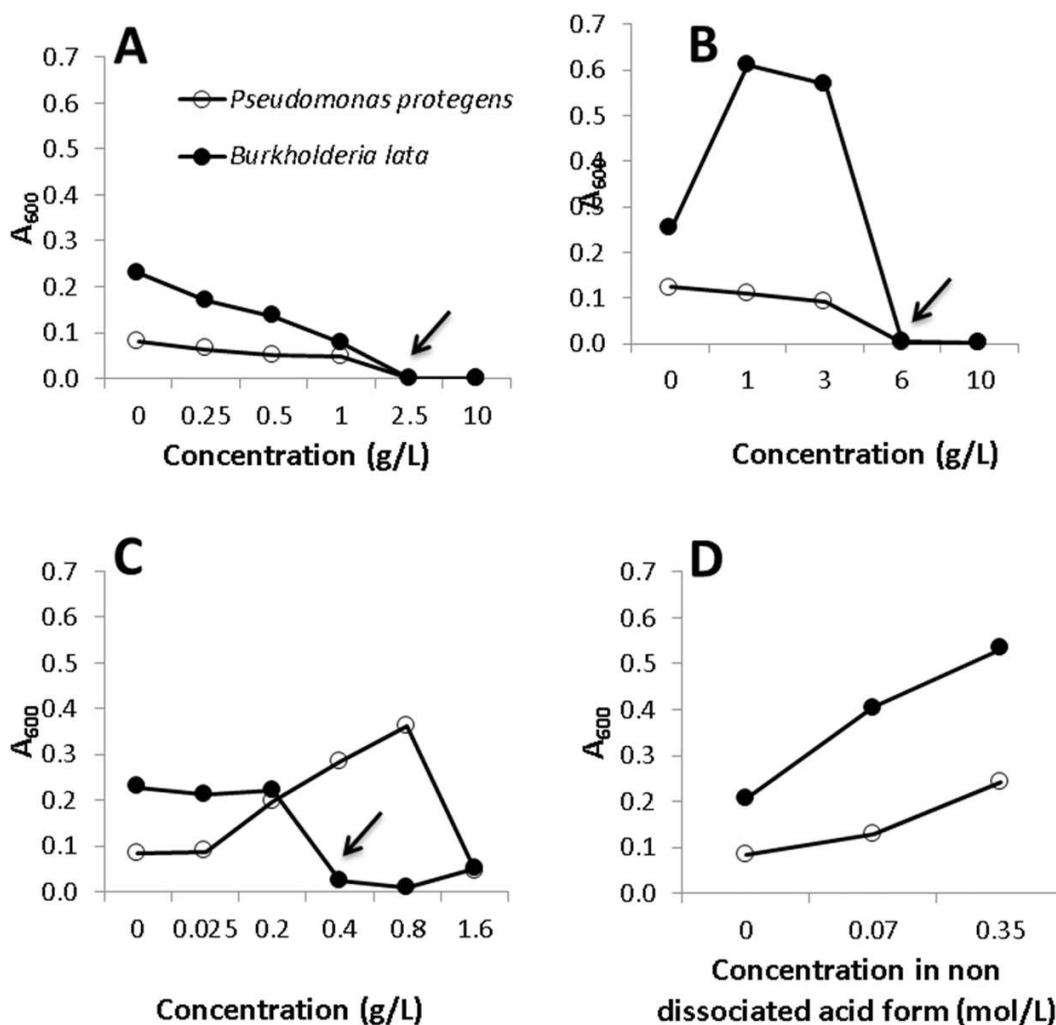


Figure 44 Maximal population density expressed as maximal A_{600} after 48h incubation at 30°C under agitation 200 rpm in PCB10, example of *Pseudomonas protegens* IA_RC_09 (○) and *Burkholderia lata* IA_RC_17 (●) submitted to different concentrations of preservatives, plant extracts, or organic acids. A: 2-phenoxyethanol; B: benzyl alcohol; C : green tea extract 90% polyphenols; D: citric acid at pH=5. Arrows indicate MIC.

Tableau 21 : Minimal inhibitory concentrations (g/L) of various antimicrobials and potential antimicrobial compounds on three *Pseudomonas* sp. and four *Burkholderia* sp. strains isolated from orange blossom and rose hydrosols, after 48h incubation at 30°C, under agitation 200 rpm. P1: *P. protegens* IA_RC_09 ; P2 : *P. veronii* IA_RC_05 ; P3 : *P. panacis* IA_RC_13; B1: *B. ambifaria* IA_FO_08; B2: *B. lata* IA_RC_17; B3: *B. lata* IA_FO_15; B4: *B. vietnamiensis* IA_FO_09; Pa1: *P. aeruginosa* CIP 100720T; Pa2: *P. aeruginosa* CIP 107832; Pa3: *P. aeruginosa* CIP 82.118; Pa4: *P. aeruginosa* CIP 76.110.

Category	Compounds	MIC (g/L) of the antimicrobial compounds against the indicated bacteria										
		P1	P2	P2	B1	B2	B3	B4	Pa1	Pa2	Pa3	Pa3
antimicrobial compounds authorized for application into cosmetic products	2-phenoxyethanol	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
	Elestab fl 15	10	5.0	10	5.0	10	10	10	>10	10	>10	>10
	Microcare ito	0.2	<0.015	<0.015	0.2	0.2	1.0	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
	Cosgard	<2.0	<2.0	<2.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	Benzyl alcohol	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Organic acids at pH=5	Grapefruit seed extract (liquid)	0.09	0.3	0.09	0.3	0.9	3.0	0.3	<3.0	<3.0	<3.0	<3.0
	Ethanol	25	25	25	25	25	25	25	50	25	25	25
	Potassium sorbate	0.8	0.8	0.8	>2.0	1.7	2.0	2.0	nt	nt	nt	nt
	Sodium benzoate ^a	0.6	1.2	0.6	4.8	2.4	2.4	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
	Sodium dehydroacetate	>6	6	6	>6	>6	>6	>6	nt	nt	nt	nt
Antimicrobial peptid	<i>trans</i> -ferulic acid	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	nt	nt	nt	nt
	Citric acid	>5	5	>5	>5	>5	>5	>5	nt	nt	nt	nt
	DL-malic acid	>5	>5	5	>5	>5	>5	>5	nt	nt	nt	nt
	Lactic acid	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	nt	nt	nt	nt
	Nisin	>1	1	1	>1	>1	>1	>1	nt	nt	nt	nt
Plant extracts	Panax ginseng	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	nt	nt	nt	nt
	Green tea extract 50% polyphenols	0.8	0.8	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	>0.8	>0.8	>0.8	>0.8
	Green tea 90% polyphenols	1.6	0.8	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	>1.6	1.6	>1.6	>1.6
	Grapefruit seed 50% flavonoids	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	nt	nt	nt	nt
	Grape seed 50% polyphenols	1	>1	0.5	>1	>1	>1	>1	nt	nt	nt	nt

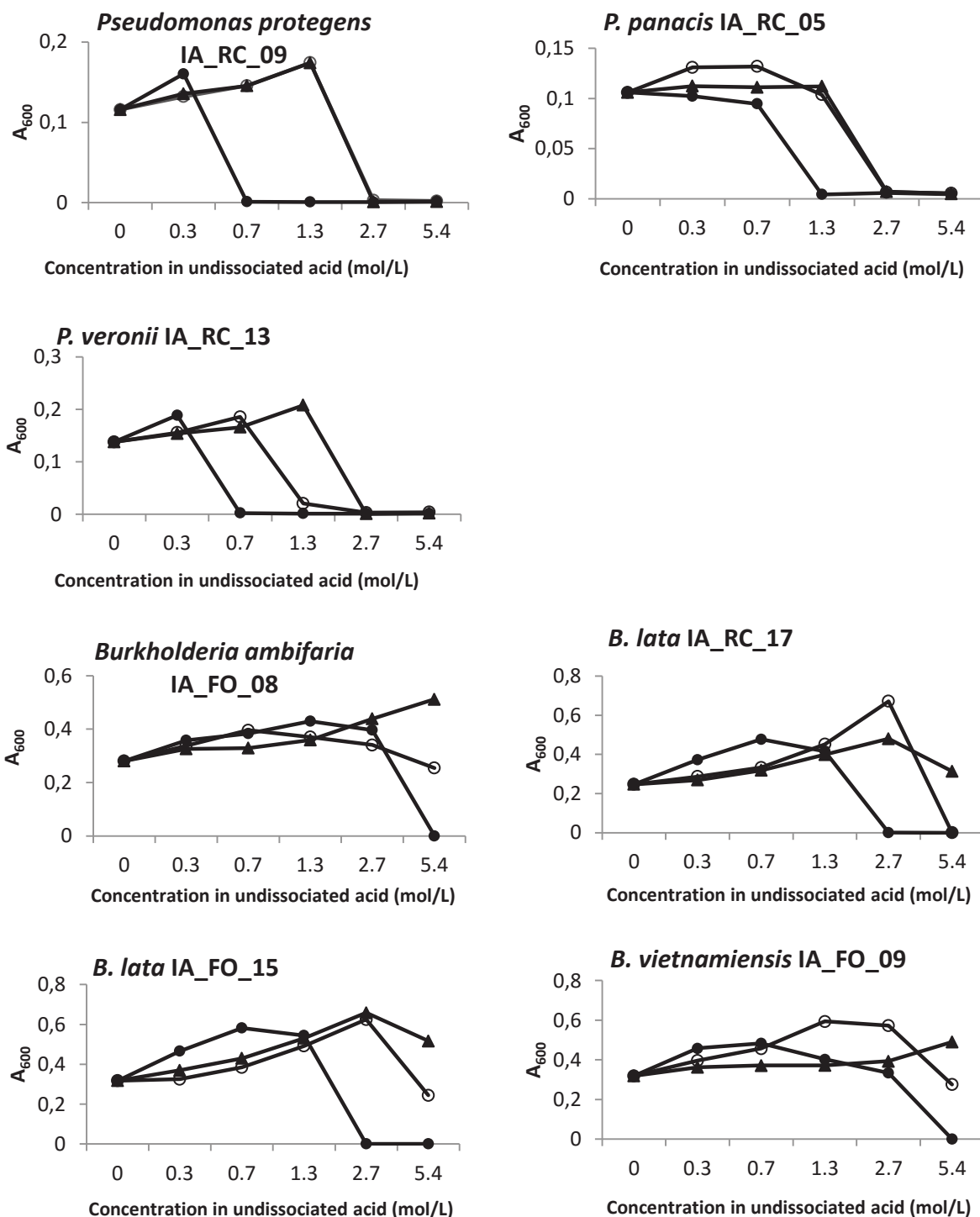


Figure 45 : Maximal population density expressed as maximal A_{600} after 48h incubation at 30°C under agitation 200 rpm in PCB10 of *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains isolated from hydrosols, subjected to different concentrations of sodium benzoate (●) and potassium sorbate (○) alone, and in combination (▲).

- **Efficiency of preservatives in hydrosols**

Effective preservatives in liquid medium PCB10 were tested in both hydrosols, on a mixture of the seven hydrosol isolated strains (*P. protegens* IA_RC_09; *P. veronii* IA_RC_05; *P. panacis* IA_RC_13 ; *Bu ambifaria* IA_FO_08; 2 strains of *Bu. lata* IA_RC_17 and IA_FO_15; *Bu. vietnamiensis* IA_FO_09) (Figure 46 and tableau 22). The seven hydrosol strain mixture cannot survive in orange blossom hydrosol incubated at 5°C. All preservatives show a bactericidal activity against the strains mixture, even at 30°C and 5°C, in both studied hydrosols. The MIC and minimal bactericide concentration (MBC) are identical. The MBC of 2-phenoxyethanol on the mixture of the seven hydrosol strains is 2.5 g/L in all conditions. The MBC of the chlorphenesin and methylparaben mixture (Elestab[®] FL15) is 3 g/L in orange blossom hydrosol stored at 30°C, and 10 g/L in rose hydrosol at both temperatures. The benzyl alcohol, and the mixture of benzyl alcohol added with 6 g/L sodium dehydroacetate, exhibit the same MBCs. Their MBCs in orange blossom and rose hydrosols stored at 30°C are 5 g/L whereas their MBCs in rose hydrosol stored at 5°C are 1 g/L; the addition of sodium dehydroacetate has no influence on the antibacterial activity on benzyl alcohol. The MBC of sodium benzoate in both orange blossom and rose hydrosols stored at 30°C is 2.4 g/L, whereas its MBC in rose hydrosol stored at 5°C is 1.2 g/L.

It is worth noting that the antibacterial concentrations recored in hydrosol and in PCB10 were quite similar. This suggests that the enrichment of the medium in nutrients did not favour survival or promote growth of the tested bacterial strains.

The sodium benzoate and the cosmetic preservatives are effective to prevent hydrosol spoilage in the studied concentrations. Moreover, a cold storage (5°C) enhances preservative efficiency in both hydrosols.

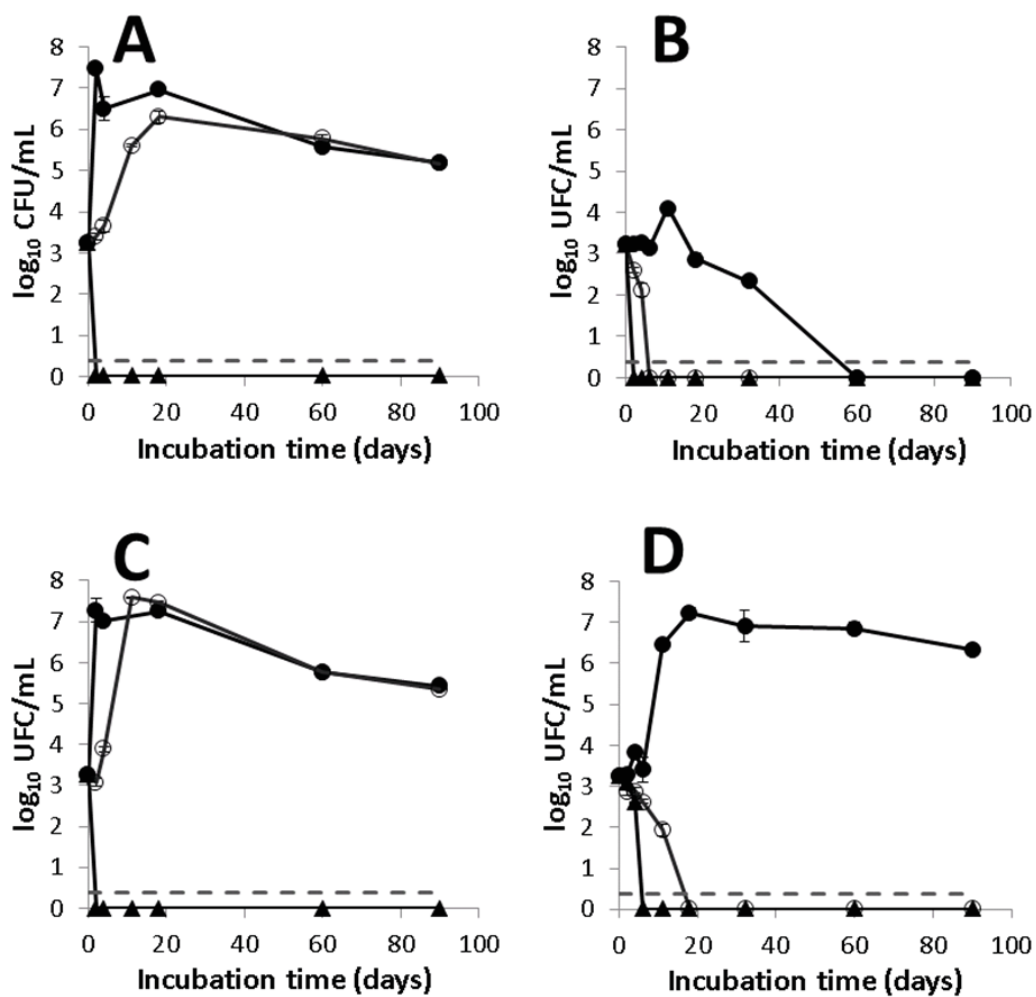


Figure 46: Fate of mixture of strains isolated from hydrosol in orange blossom hydrosol (A, B) and rose flower hydrosol (C, D) containing benzyl alcohol at 0 g/L (●), 1 g/L (○), and 5 g/L (▲) incubated at 5°C and 30°C (A, C) and 5°C (B, D). Dotted line: detection limit.

Tableau 22 Changes in counts of a bacterial inoculum made of 3 *Pseudomonas sp.* strains and 4 *Burkholderia sp.* strains isolated from hydrosols, mixed at equal concentrations and then submitted to various antimicrobials and potential antimicrobial compounds, inoculated in orange blossom (*Citrus aurantium*) and rose flower (*Rosa centifolia*) hydrosols, stored at 5°C and 30°C during 3 months. (mean ± standard deviation of n=3 replicates)

		Increase or reduction in bacterial populations (log ₁₀ CFU/ml) after a 3-month-day incubation at 30°C in the hydrosol of:			
		Orange blossom hydrosol		<i>Rosa centifolia</i> hydrosol	
Preservative	Concentration (g/L)	5°C	30°C	5°C	30°C
2-phenoxyethanol	0	<-3.1 ^a ± 0.07	+ 3.8 ± 0.2	+ 3.4 ± 0.1	+ 3.5 ± 0.1
	0.75	<-2.7 ± 0.04	+ 4.3 ± 0.06	+ 3.7 ± 0.07	+ 3.7 ± 0.05
	2.5	<-3.1 ± 0.07	<-3.1 ± 0.07	<- 3.1 ± 0.07	<- 3.1 ± 0.07
Elestab FL 15®	0	<-3.1 ± 0.07	+ 3.8 ± 0.2	+ 3.2 ± 0.3	+ 3.5 ± 0.2
	3	<-2.7 ± 0.04	<-2.7 ± 0.04	+ 3.8 ± 0.06	+ 3.6 ± 0.1
	10	<-3.1 ± 0.07	<-3.1 ± 0.07	<- 3.1 ± 0.07	<- 3.1 ± 0.07
Benzyl alcohol	0	<-3.3 ± 0.03	+ 3.7 ± 0.10	+ 3.6 ± 0.1	+ 4.0 ± 0.04
	1	<-3.3 ± 0.03	+ 3.1 ± 0.13	<-3.3 ± 0.03	+ 4.2 ± 0.04
	5	<-3.3 ± 0.03	<-3.3 ± 0.03	<-3.3 ± 0.03	<-3.3 ± 0.03
Benzyl alcohol + 6 g/L sodium dehydroacetate	0	<-3.3 ± 0.03	+ 3.7 ± 0.10	+ 3.6 ± 0.1	+ 4.0 ± 0.04
	1	<-3.3 ± 0.03	+ 3.1 ± 0.07	<-3.3 ± 0.03	+ 4.2 ± 0.05
	5	<-3.3 ± 0.03	<-3.3 ± 0.03	<-3.3 ± 0.03	<-3.3 ± 0.03
Sodium benzoate	0	<-3.1 ± 0.06	+ 3.6 ± 0.11	+ 4.2 ± 0.1	+ 4.3 ± 0.05
	1.2	<-3.1 ± 0.06	+ 3.3 ± 0.03	<-3.1 ± 0.06	+ 3.9 ± 0.2
	2.4	<-3.1 ± 0.06	<-3.1 ± 0.06	<-3.1 ± 0.06	<-3.1 ± 0.06

^a Initial concentration was approx. 3 log₁₀ CFU/mL

Conclusion

The viability of some spoilage and pathogenic microorganisms such as *Ba. cereus* or *St. aureus* decreased to undetectable level in hydrosols ($<0.4 \log_{10}$ CFU/mL), except the tested bacteria belonging to *Pseudomonas* (including *P. aeruginosa*) and *Burkholderia* genus that could grow in both hydrosols to almost 10^6 CFU/mL. Other tested pathogenic microorganisms such as *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes*, and *Candida albicans* could survive in rose hydrosol. Their multiplication is not required in hydrosols and could be prevented by the addition of some preservatives. The most efficient preservatives are commercial mixtures containing thiazolinones (Microcare® IT/ITO), benzyl alcohol and dehydroacetic acid (Cosgard), grapefruit seed liquid extract (EPP), or pure compound solution of benzyl alcohol. These are effective when concentrations are close to the maximal recommended concentration in European cosmetic regulations (CE) 1223/2009. The organic acid sodium benzoate is also effective in all tested strains at cosmetic use concentrations. Other preservatives are not effective on all strains and/or are not adapted to hydrosol stabilization. The starvation stress is already known to enhance microbial resistance (Van Overbeek, Eberl *et al.* 1995; Gu and Mazzola 2001; Poole 2014). The hydrosol strains, previously submitted to starvation, seem to be resistant to organic acid.

Acknowledgments

This work is a partial fulfillment of Cécile Labadie's PhD thesis, who has received a grant from the Association National de la Recherche et de la Technologie, Paris, France. Thanks are due to Claire Dargaïgnaratz and Catherine Renard for their contribution to the smooth-running of the experiments.

5.2.2. Résultat complémentaire

5.2.2.1. Essai d'un extrait de romarin

Nous avons également testé l'effet d'un extrait de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Stabilenhance® WSR 4 Naturex, Avignon, France) sur la capacité de croissance des 7 bactéries isolées des hydrolats (*P. protegens* IA_RC_09 ; *P. veronii* IA_RC_05 ; *P. panacis* IA_RC_13; *B. ambifaria* IA_FO_08; *B. lata* IA_RC_17; *B. lata* IA_FO_15; et *B. vietnamiensis* IA_FO_09). Pour cela, nous avons effectué un suivi de l'évolution de la population bactérienne dans un milieu de culture PCB10 tel que décrit au paragraphe 4.4.3.

Nous avons pu remarquer, figure 47, que l'absorbance à 600 nm (A_{600}) après 48 heures d'incubation à 30°C sous agitation 200 rpm augmente avec l'augmentation de la concentration en extrait de romarin. Cette absorbance est proportionnelle à la concentration bactérienne présente dans l'échantillon. Nous pouvons donc conclure que cet extrait de romarin est utilisé comme substrat de croissance par les bactéries testées. Selon la littérature, l'acide rosmarinique présente une CMI de 5 mg/L contre *Staphylococcus aureus*, mais il semble inefficace contre d'autres souches bactériennes telles que *E. coli*, *Bacillus cereus* ou des bactéries pathogènes buccales (CMI >250 mg/L et >400 mg/L selon les souches). L'activité antibactérienne de l'extrait de romarin semble plutôt liée à la présence d'acide carnosique et de carnosol (Moreno, Scheyer *et al.* 2006; Bernardes, Lucarini *et al.* 2010). Selon les données du fournisseur, l'extrait de romarin testé lors de cette expérience contient 40 à 45 g/L d'acide rosmarinique. Il n'y a pas de données sur la concentration en acide carnosique et en carnosol. Nous pouvons donc conclure que les concentrations en acide rosmarinique utilisées lors de cette étude, ainsi comprises entre 4 et 640 mg/L, ne permettent pas d'inhiber la croissance bactérienne des souches testées, et que un ou plusieurs composants de cet extrait sont utilisés comme substrat de croissance.

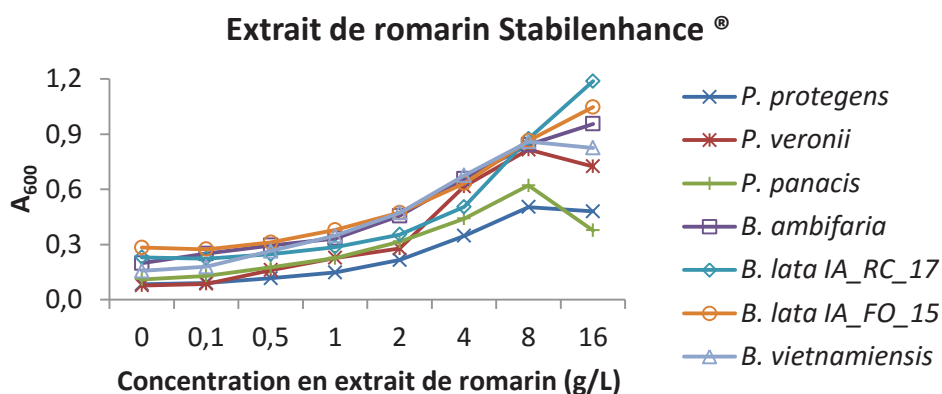


Figure 47 Effet de l'extrait de romarin sur les souches isolées d'hydrolats. Cet extrait est utilisé comme substrat de croissance par les souches bactériennes testées.

5.2.2.2. Impact du milieu de culture sur le comportement d'un mélange bactérien soumis à différents antimicrobiens.

Dans l'article présenté précédemment, nous avons parlé des résultats obtenus dans du milieu PCB10 et dans les hydrolats. Lors de cette thèse, nous avons également testé une étape intermédiaire : dans un milieu de culture PCB300 (milieu PCB dilué d'un facteur 300) afin de se rapprocher au mieux des conditions rencontrées dans les hydrolats tout en s'affranchissant de l'effet des composés volatils sur les bactéries, et de n'observer ainsi que l'effet de l'oligotrophie du milieu. La population maximale observée dans un tel milieu avoisine la population maximale observée dans les hydrolats, i.e. entre 6 et 7 log₁₀ UFC/mL. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 23 ci-dessous.

Tableau 23 Accroissement maximal ou réduction de la population bactérienne (log₁₀ UFC/mL) après 15 jours d'incubation à 30°C ou 5°C sous agitation 200 rpm d'un inoculum de 3 log₁₀ UFC/mL, composé d'un mélange des 7 souches isolées des hydrolats (*P. protegens* IA_RC_09 ; P2 : *P. veronii* IA_RC_05 ; P3 : *P. panacis* IA_RC_13; B1: *B. ambifaria* IA_FO_08; B2: *B. lata* IA_RC_17; B3: *B. lata* IA_FO_15; B4: *B. vietnamiensis* IA_FO_09), mélangées à concentration égales puis soumises à différents antimicrobiens potentiels dans un milieu de culture PCB300 (moyenne ± écart type de n=3 répliqués).

Conservateur	Concentration (g/L)	5°C	30°C
2-phénoxyéthanol	0	+ 3,9 ± 0,1	+ 4,3 ± 0,1
	0,25	+ 4,3 ± 0,04	+ 4,1 ± 0,04
	0,75	+ 4,0 ± 0,04	+ 4,0 ± 0,1
	2,5	- 0,3 ± 0,03	<-3,1 ± 0,02
Elestab FL 15®	0	+ 4,5 ± 0,03	+ 4,4 ± 0,07
	1	+ 4,6 ± 0,03	+ 4,4 ± 0,04
	3	+ 4,4 ± 0,1	+ 4,7 ± 0,05
	10	<-3,0 ± 0,02	<-3,0 ± 0,02
Alcool benzylique	0	+ 4,4 ± 0,02	+ 4,4 ± 0,1
	1	- 0,4 ± 0,1	+ 2,2 ± 0,1
	5	<-3,1 ± 0,1	<-3,1 ± 0,1
	10	<-3,1 ± 0,1	<-3,1 ± 0,1
Alcool benzylique + 6 g/L déhydroacétate de sodium	0	+ 4,4 ± 0,1	+ 4,3 ± 0,03
	1	- 1,0 ± 0,1	+ 3,1 ± 0,1
	5	<- 3,1 ± 0,1	<- 3,1 ± 0,1
	10	<- 3,1 ± 0,1	<- 3,1 ± 0,1
Sodium benzoate ajusté à pH=5,0	0	+ 4,8 ± 0,01	+ 4,7 ± 0,1
	1,2	- 0,6 ± 0,1	+ 4,5 ± 0,1
	2,4	- 1,5 ± 0,3	<- 2,8 ± 0,1
	4,8	<- 2,8 ± 0,1	<- 2,8 ± 0,1
EPP	0	+ 4,2 ± 0,1	+ 4,3 ± 0,1
	0,09	<-3,2 ± 0,02	+ 4,3 ± 0,04
	0,3	<-3,2 ± 0,02	<-3,2 ± 0,02
	0,9	<-3,2 ± 0,02	<-3,2 ± 0,02

Tableau 23 ci-dessus, nous pouvons observer que les antimicrobiens testés à 30°C présentent tous une concentration inhibitrice équivalente à celle observée dans du milieu PCB10 (également incubé à 30°C) (comparer avec le tableau 21), les conditions oligotrophes du milieu n'ont donc pas d'effet sur la croissance des bactéries étudiées. Nous pouvons également remarquer sur ce tableau que la croissance des bactéries soumises à du phénoxyéthanol, et incubées à 5°C, est inhibée mais on n'observe pas de décroissance de la population bactérienne pendant la période étudiée. Ainsi le froid, sûrement par les modifications qu'il provoque sur la physiologie bactérienne, ralentit (ou empêche) l'effet bactéricide du phénoxyéthanol, il serait donc préférable d'utiliser le phénoxyéthanol à température ambiante.

Maintenant, si on compare les résultats obtenus lors de cette expérience (PCB300) avec les résultats obtenus dans les hydrolats (Figure 48 ci-après), à 30°C et à 5°C, nous pouvons remarquer plusieurs choses :

Synergie type d'hydrolat / antimicrobien

On remarque qu'il n'y a aucune différence de comportement des bactéries entre le milieu PCB300 et l'hydrolat de rose (*Rosa centifolia*). Nous pouvons par contre remarquer un effet de synergie entre certains antimicrobiens et le type d'hydrolat, ça a été le cas ici pour l'hydrolat de fleur d'oranger additionné d'Elestab FL 15® incubé à 30°C pour lequel on observe un effet bactéricide à 3 g/L au lieu de 10 g/L dans les autres milieux testés.

Synergie froid (5°C) / type d'hydrolat

On remarque qu'il peut exister un effet de synergie entre le froid et le type d'hydrolat, c'est le cas ici pour l'eau de fleur d'oranger incubée à 5°C dans laquelle la population bactérienne a décrut en dessous de la limite de détection ($<0,7 \log_{10}$ UFC/mL) dans tous les échantillons testés. Ce qui n'a pas été le cas dans l'eau de rose et le milieu PCB300.

Synergie froid (5°C) / antimicrobien

Nous pouvons remarquer ici que la quantité nécessaire d'alcool benzylique et de benzoate de sodium pour observer un effet bactéricide, dans l'eau de rose et dans le milieu PCB300, est inférieure lors d'un stockage au froid en comparaison avec un stockage à 30°C. L'efficacité de ces antimicrobiens est donc améliorée par un stockage au froid (5°C).

En l'absence d'antimicrobiens, les bactéries étudiées n'ont pas été capables de se multiplier dans l'eau de fleur d'oranger incubée à 5°C sous agitation 200 rpm (données non présentées). Ainsi, l'eau de fleur d'oranger conservée au froid (sans rupture de la chaîne du froid pendant toute la durée de vie du produit) montre une tendance naturelle à inhiber la croissance des bactéries habituellement retrouvées dans les hydrolats. Dans le cas de l'eau de rose (*Rosa centifolia*), la

croissance bactérienne peut avoir lieu à 30°C mais également à 5°C, le stockage au froid n’aura pas d’effet inhibiteur naturel, l’addition d’antimicrobien sera donc requise quelle que soit la température de stockage. Enfin, l’ajout d’alcool benzylique ou de benzoate de sodium associés à un stockage au froid permet d’améliorer l’action antimicrobienne et de réduire la quantité de conservateur nécessaire dans tous les milieux étudiés.

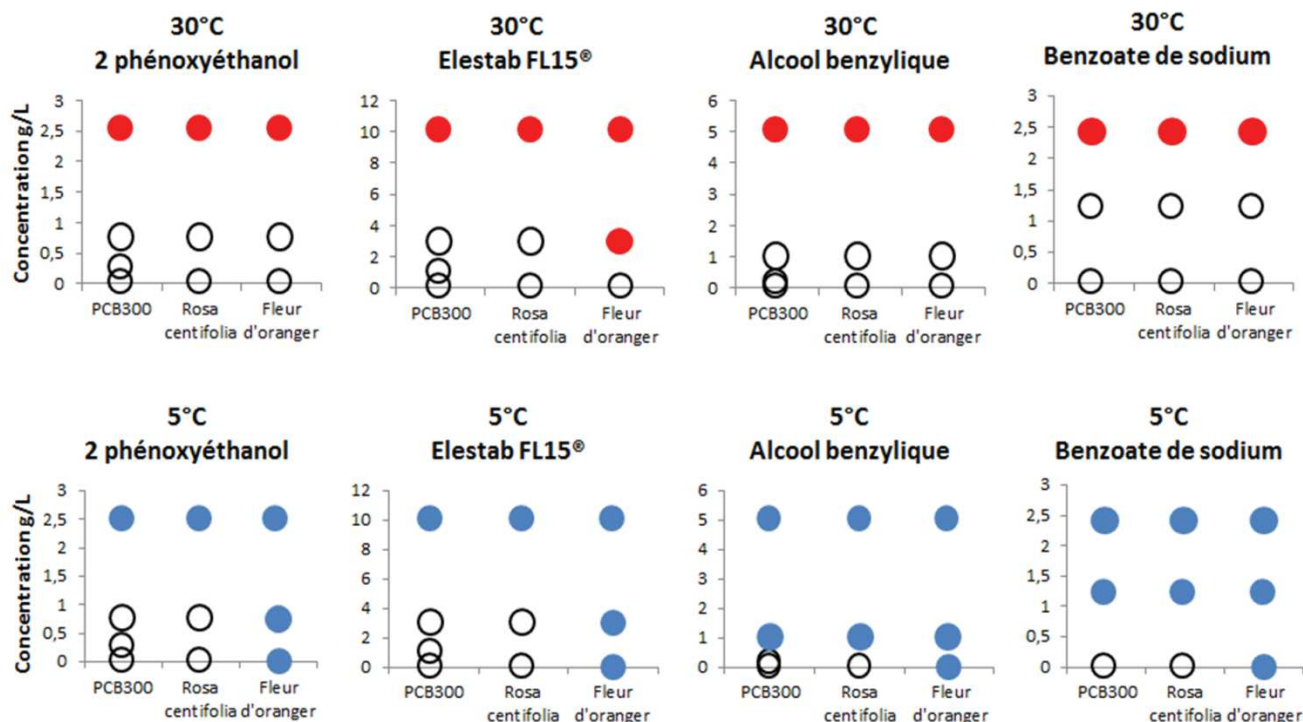


Figure 48 Effet de 4 antimicrobiens dans du milieu PCB300 et dans les hydrolats (*Rosa centifolia* et *Citrus aurantium*) sur un mélange de 7 souches isolées des hydrolats (*P. protegens* IA_RC_09 ; P2 : *P. veronii* IA_RC_05 ; P3 : *P. panacis* IA_RC_13; B1: *B. ambifaria* IA_FO_08; B2: *B. lata* IA_RC_17; B3: *B. lata* IA_FO_15; B4: *B. vietnamiensis* IA_FO_09), mélangées à concentration égales, incubées à 30°C ou 5°C sous agitation 200 rpm pendant un période minimale de 15 jours. n=3 réplicats. Rouge/en haut : incubation à 30°C ; Bleu/en bas : incubation à 5°C. Ronds pleins : effet inhibiteur ; Ronds vides : pas d’inhibition observée à cette concentration.

5.2.3. Highlights

- Les hydrolats favorisent la croissance des bactéries appartenant aux genres *Burkholderia sp.* et *Pseudomonas sp.* (incluant *Pseudomonas aeruginosa*).
- Quelques souches testées sont capables de survivre uniquement dans l'eau de rose de mai. La population de toutes les autres souches diminue en dessous du seuil de détection (<0,4 log₁₀ UFC/mL).
- Les souches isolées des hydrolats semblent bien adaptées aux conditions oligotrophes et de pH rencontrées dans les hydrolats.
- Certaines espèces, telles que *N. capsulatum* par exemple, dépendraient des résidus et métabolites ou produits laissés par d'autres espèces pour se multiplier dans les hydrolats.
- La croissance des souches testées dans les hydrolats peut être maîtrisée par l'addition de conservateurs.
- Ces conservateurs doivent être adaptés aux réglementations cosmétiques et agroalimentaires, et doivent respecter les propriétés organoleptiques des hydrolats.
- Les conservateurs les plus efficaces sont l'alcool benzylique (seul ou en mélange avec l'acide déhydroacétique comme dans le Cosgard®), le mélange de thiazolinones (Microcare® IT/ITO), l'extrait commercial de pépin de pamplemousse (EPP), ainsi que le benzoate de sodium à pH=5 concentré à 2,4 g/L (soit 19,7 mmol/L en forme non dissociée). A des pH plus élevés, il est probable que les concentrations efficaces seront aussi plus élevées.
- Certains composés testés peuvent être utilisés comme substrats de croissance par des microorganismes.

6. Conclusion et perspectives

Avant de commencer ce projet de thèse, nous pensions que seulement quelques lots d'hydrolats montrant des signes de non-conformité étaient contaminés par des microorganismes (cf Annexe 1 par exemple). Mais les analyses microbiologiques ont montré que tous les échantillons d'hydrolats prélevés pendant leur période de stockage étaient contaminés par des populations bactériennes pouvant atteindre 6 à 7 log₁₀ UFC/mL, sans pour autant montrer de signe de non-conformité, i.e. sans changement de turbidité, de couleur, et/ou d'odeur. Ces produits sont donc beaucoup plus sensibles aux contaminations bactériennes que ce que nous pensions.

Les causes de telles contaminations ont tout d'abord été recherchées dans la nature des substrats présents dans les hydrolats. Pour cela, nous avons assisté à plusieurs campagnes de production nous permettant de récupérer des hydrolats stériles, n'ayant jamais été contaminés donc jamais métabolisés par les microorganismes, et ayant donc la composition initiale qui nous servira de référence. Dans un premier temps, nous avons recherché la présence de composés végétaux (entraînés vers le distillat par effet de primage et de moussage) par des méthodes d'analyse simples. Nous avons ainsi tenté de déterminer la présence de sucres, d'acides aminés ou protéines, ainsi que le poids sec des hydrolats. Ces méthodes n'ont pas pu mettre en évidence la présence d'acides aminés ou de protéines (<2 mg/L), mais nous avons pu remarquer la présence de 0,21 mg/L à 0,38 mg/L de glucides. Le poids sec quant à lui, variait de 4,0 à 702 mg/L. Des analyses plus poussées, utilisant la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse ont permis de confirmer la présence de polyosides, mais également de mettre en évidence la présence de glycérol et d'acide glycolique pouvant être métabolisés par les microorganismes. A ce stade, seule une faible proportion de cette fraction non-volatile a été identifiée. Une investigation supplémentaire pour l'identification des composés non-volatils est à envisager. Ceci peut être effectué par l'injection de cette fraction en phase aqueuse, par HPLC ou UPLC couplée à un spectromètre de masse par exemple, évitant l'étape de dérivation nécessaire à l'analyse en chromatographie gazeuse. Lors de cette thèse, nous avons fait un essai d'injection en UPLC-HR-MS dont nous n'avons pu tirer aucun résultat du fait de la présence d'une importante forêt de pics non identifiés (données non présentées). Une étape de mise au point et d'analyse du signal devrait être effectuée. L'identification des composés ne pouvant pas être identifiés à l'aide des bases de données accessibles (telles que Nist, Wiley, ou encore Golm Metabolome Database) pourrait être améliorée/permise par la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) et permettre ainsi l'étude des voies de fragmentation des ions parents. Pour aller plus loin, la mise en évidence de marqueurs chimiques présents dans cette fraction non volatile des hydrolats (contaminés et non contaminés) pourrait permettre à terme de déterminer l'authenticité, voir la provenance des hydrolats.

La recherche de substrat de croissance nous a également emmené à nous intéresser à la capacité de métabolisation des composés volatils par les bactéries. Nous avons ainsi pu remarquer que les

deux souches étudiées pour leur impact sur les composés aromatiques (*B. vietnamiensis* IA_FO_09 et *N. capsulatum* IA_FO_33) ont été capables de convertir par exemple le géraniol en 6-méthyl-5-hepten-2-one ou encore l'acétate de 2-phényléthyle en 2-phényléthanol, mais également de produire des oxydes de linalol, ou l'acide gérannique. La conversion des composés volatils par certaines bactéries permet d'expliquer le changement d'odeur observé dans certains lots d'hydrolats. En ce sens, nous pouvons noter que la présence de 6-méthyl-5-hepten-2-one (également appelée sulcatone) est spécifique d'une contamination par *N. capsulatum*. Il peut donc être utilisé comme marqueur chimique de la présence de ce type de contamination bactérienne.

Nous avons remarqué que les eaux florales étaient stériles (et le restaient) en sortie d'essencier mais que celles-ci étaient rapidement contaminées dès leur passage dans la cuve de transfert. Les contaminations interviennent lors des opérations de transvasement, d'échantillonnage ou de stockage qui ont lieu à l'air libre et dans des contenants propres mais non stériles. Leur stabilité pourrait donc être permise par la mise en place de conditions aseptiques dès la fin de la distillation, par exemple par l'utilisation de sacs stériles, de capacité 200 à 1000 L, reliés directement à la sortie de l'essencier (en présence d'UV), tels que ceux utilisés pour l'industrie des sauces tomates par exemple. Puis la mise en place de bouchons à filtre 0,22 µm ou 0,45 µm permettant l'évaporation des composés les plus volatils, tels que le sulfure de diméthyle, responsables de l'odeur de « bouilli ». En l'absence de conditions aseptiques, et afin d'éviter l'ajout de conservateur, le stockage dès la fin de la distillation dans des contenants stériles, et un stockage hermétique ou possédant une ouverture munie d'un filtre à 0,22 µm ou 0,45 µm permettrait de limiter le nombre de lots contaminés.

Dès le contact des hydrolats avec l'air libre, une contamination bactérienne peut survenir. Il pourrait donc être judicieux d'utiliser des conditionnements stériles à usage unique moins volumineux et/ou munis d'un système de prélèvement stérile, afin d'éviter la contamination de grands volumes d'eaux florales dès leur première utilisation. Une filtration est parfois effectuée quelques temps après la distillation. Pour être efficace, cette filtration devrait avoir lieu en conditions aseptiques tel que suggéré ci-dessus, sinon elle permet simplement de réduire temporairement (pendant quelques jours) la population bactérienne.

Le procédé de distillation enrichi les hydrolats en composés non-volatils, par effet de primage et de moussage. Cet effet pourrait être réduit par modification du procédé de distillation. La température d'ébullition est un facteur important de cet effet de primage et de moussage, mais nous savons que les cuves de distillation sont généralement chauffées par envoi de vapeur d'eau contre les parois ou les serpentins de chauffe, cette température est bien contrôlée et ne dépasse pas les 100°C. Il n'est donc pas nécessaire d'intervenir sur la température de chauffe. Cet effet pourrait être contrôlé par ajout d'une colonne de distillation par exemple, un fractionnement lors de la distillation permettant une meilleure séparation des composés, mais rallongeant en

contrepartie le temps de distillation. Réduire l'effet de primage et de moussage pourrait permettre de réduire la quantité de matière organique non-volatile, et donc potentiellement la quantité de biomasse, mais nous savons que certaines bactéries sont capables d'utiliser les composés volatils comme seule source de carbone (Vandenbergh 1989). Une élimination/réduction des composés non-volatils dans le distillat ne garantit donc pas nécessairement une amélioration de la stabilité des hydrolats. Des expériences complémentaires en laboratoire, telles qu'une distillation fractionnée de fleurs fraîches dans des conditions contrôlées puis inoculation du distillat avec des souches bactériennes préalablement isolées d'un même type d'hydrolat, et contrôle de la quantité de matière sèche en parallèle (avec et sans fractionnement), permettraient d'avoir un premier recul sur l'effet d'une telle modification.

Une modification du procédé de distillation, que ce soit pour obtenir des conditions aseptiques ou pour réduire l'effet de primage, serait fastidieuse à mettre en place sur l'ensemble de la filière, notamment à cause du coût de telles installations, en comparaison avec le coût de revient d'un hydrolat. L'addition de conservateurs dans les hydrolats est une option plus facilement envisageable afin d'assurer leur stabilité, présentant un coût immédiat moins important, et permettant également de stabiliser les hydrolats provenant des différents fournisseurs. Ces conservateurs doivent être inertes vis-à-vis des propriétés visuelles et organoleptiques des hydrolats et respecter les réglementations cosmétiques et agroalimentaires. Afin de pouvoir choisir des conservateurs adaptés, nous devons avoir une meilleure connaissance du microbiote des hydrolats et des bactéries capables de s'y développer.

L'identification des microorganismes présents dans les hydrolats a permis de mettre en évidence la présence largement majoritaire de bactéries à Gram-négatif. La paroi des bactéries à Gram-négatif est connue pour être moins hydrophobe que la paroi des bactéries à Gram-positif, ce qui limiterait la pénétration passive des composés volatils dans le milieu intracellulaire, et augmenterait ainsi leur résistance (Helander, Alakomi *et al.* 1998; Kim, Kang *et al.* 2011). Aucune levure ni moisissure n'a pu être observée. Cette population était majoritairement composée de bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*, tel qu'il avait déjà été remarqué sur les rares données d'identification du microbiote des hydrolats (paragraphe 2.2). Ces populations sont oligotrophes et capables de se multiplier sans facteur de croissance (Palleroni 2005^a; Palleroni 2005^b) et acido-tolérantes (Stopnisek, Bodenhausen *et al.* 2014). D'autres bactéries appartenant aux familles des *Acetobacteraceae*, comprenant les bactéries acétiques, et *Rhodospirillaceae*, se développant majoritairement dans les eaux stagnantes et capables de produire leur énergie par photosynthèse, ont également été isolées (Garrity, Brenner *et al.* 2001). Les hydrolats sélectionnent donc une flore oligotrophe et acido-tolérante tout comme l'eau minérale et certaines boissons aromatiques (paragraphe 2.4). Les tests de croissance de plusieurs bactéries pathogènes et d'altération dans les hydrolats ont permis de confirmer que les hydrolats

favorisent la croissance des bactéries capables de se multiplier sans facteur de croissance, telles que les bactéries appartenant aux genres *Burkholderia sp.* et *Pseudomonas sp.* (incluant *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau de rose de mai) à l'exception de *P. syringae* qui est incapable de se multiplier sans facteur de croissance (Palleroni 2005^a). Les conservateurs ont été testés sur les microorganismes capables de se développer dans les hydrolats. Enfin, une analyse plus approfondie du microbiote prenant en compte un plus grand nombre d'isolats permettrait d'avoir une vision plus représentative des contaminants, de leurs origines, et ainsi de mieux les maîtriser.

Jusqu'à présent, les essais de stabilisation microbiologique par ajout de conservateurs commerciaux ont montré que les conservateurs testés étaient efficaces aux concentrations maximales recommandées par la réglementation cosmétique, y compris dans le cas du benzoate de sodium dont la concentration efficace correspond à la concentration autorisée dans les produits cosmétiques, mais pas agroalimentaires. De plus, les extraits végétaux n'ont pas été efficaces contre les microorganismes testés, ou ont eu un effet sur la couleur et/ou l'odeur des hydrolats. La recherche d'autres conservateurs efficaces est donc nécessaire afin d'assurer la stabilité microbiologique des hydrolats à des fins alimentaires. L'efficacité des conservateurs testés devra être validée à l'échelle industrielle, sur des volumes d'hydrolats importants. Pour cela, il serait nécessaire d'ajouter les conservateurs dès la fin de la distillation. Cela permettrait d'éviter la production de métabolites par une première contamination qui pourrait permettre la croissance de bactéries incapables de se multiplier dans les hydrolats stériles, tel que ça a été le cas pour *N. capsulatum*, car nous n'avons aucun recul sur l'efficacité des conservateurs sur d'autres genres bactériens. Enfin, un suivi de l'évolution de la population bactérienne en conditions industrielles non-aseptique devrait être effectué tout le long de la durée de vie d'un hydrolat stabilisé, soit pendant 1 an, afin de vérifier l'efficacité des stabilisants pendant cette période.

7. Annexe

ANNEXE 1 : Exemple de cas de non-conformité

L'aspect de certains échantillons change avec le temps. Ces changements sont surtout observés dans l'eau de fleur d'oranger. Les observations présentées dans cette annexe concernent trois échantillons d'eau de fleur d'oranger, récupérés peu de temps après leur distillation, il s'agit des échantillons #6.2, #7.2, et #8.2. On a pu remarquer un changement d'aspect des échantillons #7.2 et #8.2 progressif, avec l'apparition d'une teinte marron, de plus en plus intense avec le temps (Figure 49). La turbidité de ces échantillons était quasi nulle le jour de la réception ($A_{600} \leq 0,001$) et a augmenté après 68 jours de stockage à température ambiante (Tableau 24).

Les observations microscopiques ont mis en évidence la présence d'amas bactériens, qui formaient des culots de couleur marron foncé, en quantité élevée dans le cas de l'échantillon #8.2 (Figure 50) même après une longue et vigoureuse agitation. La population bactérienne pourrait être ainsi sous-estimée. Nous avons donc effectué un test de viabilité pour savoir si ces amas étaient constitués de cellules vivantes ou non. Ce test est constitué de deux fluorochromes. Le SYTO 9 fluoresce en vert et se fixe à l'ADN de toutes les cellules, vivantes et mortes. L'iodure de propidium fluoresce en rouge et est capable de pénétrer uniquement les cellules mortes. Les résultats ont montré que les amas bactériens de l'échantillon #8.2 sont constitués de cellules mortes avec quelques bactéries viables fixées à ces amas. Il n'y a donc pas eu sous-estimation de la population.

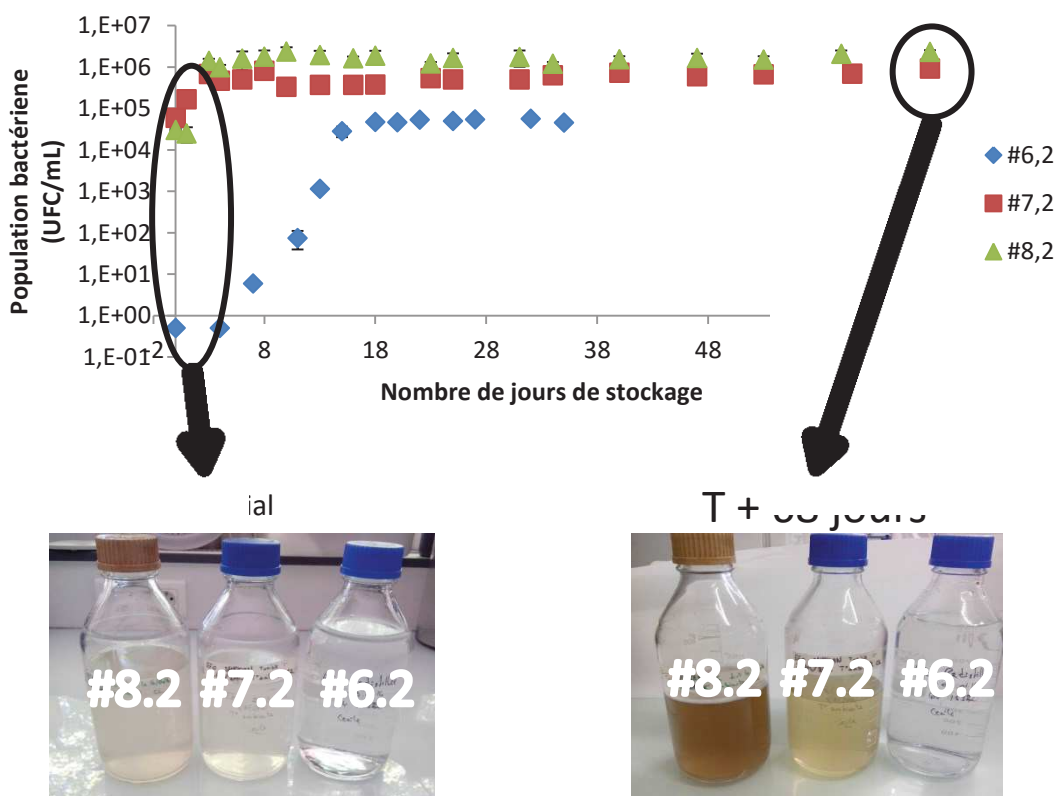


Figure 49 Evolution de la population bactérienne de trois échantillons d'eau de fleur d'oranger (#6.2, #7.2, et #8.2) en fonction du temps de stockage à température ambiante et leur changement d'aspect au cours du temps.

Tableau 24 Absorbance à $\lambda=600\text{nm}$ (A_{600}) des trois échantillons d'eau de fleur d'oranger (#6.2, #7.2, et #8.2) dès leur réception au laboratoire, entre 3 et 10 jours après leur distillation, puis après 68 jours de stockage à température ambiante.

	A_{600} T _{initial}	A_{600} T+ 68 jours
#6.2	0,001	0,002
#7.2	0,001	0,105
#8.2	0,002	0,166

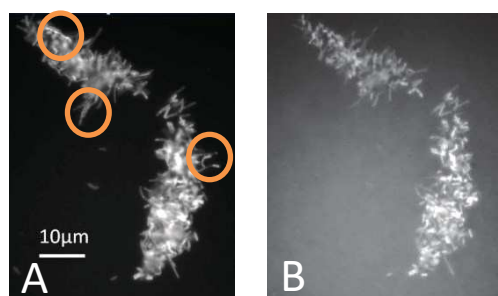


Figure 50 Test de viabilité Live/Dead sur l'eau de fleur d'oranger #8.2 (G x1000). A : fluorescence du SYTO 9 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 485/498). B : fluorescence de l'iodure de propidium ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$: 533/617). Les cercles orange représentent les cellules viables, apparaissant en A et n'apparaissant pas en B.

8. Listes des figures et des tableaux

Liste des figures :

Figure 1 Schéma du procédé d'hydrodistillation	22
Figure 2 Structure chimique de l'isoprène, unité fonctionnelle des terpènes.....	29
Figure 3 Voie de synthèse universelle des monoterpènes et sesquiterpènes.....	30
Figure 4 Précurseurs des monoterpènes, isomères du GPP (Lamarti, Badoc <i>et al.</i> 1994).	30
Figure 5 Voies de biosynthèse des principaux monoterpènes acycliques au niveau des trichomes sécréteurs des <i>Lamiacées</i> (Lamarti, Badoc <i>et al.</i> 1994).....	31
Figure 6 Biosynthèse des monoterpènes cycliques à partir du terpényle-8 (Lamarti, Badoc <i>et al.</i> 1994).....	32
Figure 7 Voie de synthèse du 2-phényléthanol à partir de la L-phénylalanine dans les pétales de rose (Hirata, Ohnishi <i>et al.</i> 2012). AADC : l'enzyme aminoacide aromatique décarboxylase; AAAT : aminoacide aromatique aminotransférase ; PAR : phénylacétaldéhyde réductase.	33
Figure 8 Composés majoritaires de l'eau de fleur d'oranger (<i>Citrus aurantium</i>) et de l'huile essentielle, le néroli. ...	34
Figure 9 Principaux composés chimiques de l'eau de rose bulgare (<i>Rosa damascena</i>) et l'huile essentielle.	35
Figure 10 Analyses microbiologiques et identification effectuées par le laboratoire du centre hospitalier universitaire d'Angers. 28 Juin 1985. Données Albert Vieille SAS.	37
Figure 11 Conclusions de l'analyse microbiologique et identification des germes à plusieurs étapes du procédé de redistillation de l'eau de fleur d'oranger de Tunisie. Laboratoire du centre hospitalier d'Angers.13 décembre 1994. Données Albert Vieille.	37
Figure 12 Différentes dynamiques théoriques de la population microbienne dans les hydrolats. Scénario 1 croissance rapide, et population maximale au niveau observé lors des analyses (●). Scénario 2 temps de latence plus long et prélèvement de l'hydrolat en milieu de phase exponentielle, la population maximale n'est pas atteinte. Scénario 3 la population bactérienne a épuisé les nutriments du milieu et est en phase de décroissance lors de l'analyse.....	38
Figure 13 Métabolisation du géraniol, du nérol, et du citronellol par <i>Pseudomonas citronellolis</i> via leurs acides respectifs et dégradation complète par beta-oxydations successives (Demyttenaere 2001).	40
Figure 14 Les deux voies de dégradation possibles du géraniol par <i>Pseudomonas incognita</i> (Demyttenaere 2001). .	41
Figure 15 Voies métaboliques de dégradation du linalol par <i>Pseudomonas incognita</i> (Demyttenaere 2001)	42
Figure 16 Métabolisation énantio-sélective du citronellol par <i>Pseudomonas spp.</i> souche L1B2P (Pimentel, Molina <i>et al.</i> 2012).	42
Figure 17 Voie de dégradation du géraniol par <i>Castellaniella defragrans</i> (Lüddeke, Wülfing <i>et al.</i> 2012).....	43
Figure 18 Voie de dégradation du linalol par <i>Castellaniella defragrans</i> (Brodkorb, Gottschall <i>et al.</i> 2010).	43
Figure 19 Voie de dégradation du linalol par <i>A. brasiliensis</i> (Demyttenaere 2001).	43
Figure 20 Structures chimiques du (E)-nérolidol (à gauche) et du (E,E)-farnésol (à droite).....	44
Figure 21 Formule chimique de l'antranilate de méthyle.....	44
Figure 22 Populations majoritairement retrouvées dans les boissons aqueuses selon la quantité en matière sèche et le pH du milieu.	58
Figure 23 Structure chimique du 2-phénoxyéthanol.	66
Figure 24 Structure chimique de la chlorphénésine.	68
Figure 25 : Structure chimique du bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol).	68
Figure 26: Voie de dégradation du bronopol <i>in vitro</i> . Structures chimiques de ses métabolites (Kireche, Peiffer <i>et al.</i> 2011).	69
Figure 27 Structure chimique de l'isothiazolinone.....	69

Figure 28 : Diagrammes de viabilité cellulaire après 0 à 24h d'exposition à différentes concentrations d'isothiazolinones (5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one). On remarque que la viabilité cellulaire décroît avec la concentration et le temps d'exposition avec les isothiazolinones (Anselmi, Ettorre <i>et al.</i> 2002).....	70
Figure 29 Structure chimique du p-hydroxybenzoate d'alkyle (parabène)	71
Figure 30 Structure chimique de l'alcool benzylique.	72
Figure 31 Schéma rassemblant les effets antimicrobiens des huiles essentielles sur la cellule bactérienne, exemple sur une bactérie à Gram-négatif. (<i>Schema Cécile Labadie</i>)	75
Figure 32 Structure chimiques des principaux composés présents dans l'extrait de feuilles de romarin.....	77
Figure 33 Structure chimique des principales catéchines. Elles comportent toutes la même structure de base et se différencient par conformation des carbones asymétriques en position 2 et 3 et la nature des groupements en R3 et R5'.	80
Figure 34 Cause de la sous-estimation du dénombrement bactérien causé par les flavonoïdes (Cushnie and Lamb 2011).	80
Figure 35 Capacité de pénétration des acides sous leur forme dissociée ou non dissociée dans la cellule bactérienne	82
Figure 36 Structure chimique de l'acide déhydroacétique	83
Figure 37 Diagram of hydrosol production showing the product at different stage of processing, and physical and chemical processes applied to the product. Containers and process equipment are indicated in italics. Products and fractions are in bold characters. * indicates sampling locations.....	124
Figure 38 Changes in bacterial counts at 5°C (▲) and 20°C (O) in orange blossom (<i>Citrus aurantium</i>) (A, B) and rose C. (<i>Rosa centifolia</i>) (C, D) in hydrosols from different origins and/or year of production. Three microbiological counts have been performed at each sampling date and each was represented by a dot.	134
Figure 39 Impact of <i>Bu. vietnamiensis</i> and <i>N. capsulatum</i> on aromatic compounds in <i>Rosa centifolia</i> (A) and <i>Citrus aurantium</i> (B) hydrosols after 10 days of incubation.	137
Figure 40 Supplementary data S1: Maximum likelihood phylogenetic tree based on <i>rrs</i> gene sequences of all representative species from hydrosols. The phylogenetic positions of 19 representative isolates (17 identified species and two unidentified species <i>Acetobacteraceae gen.nov.</i> (LN831189) and <i>Rhodospirillaceae gen. nov.</i> (LN831188) are indicated in boldface and are shown among a selection of 22 representative reference strains (type-strains) in the families Rhodospirillales, Pseudomonadales and Burkholderiales. The number of isolates isolated from hydrosols for each species is noticed within parentheses (n). Values of node supports above 80% are given at each branch point.	139
Figure 41 Evolution de la population bactérienne en fonction du temps de stockage de l'eau de rose de mai prélevée dans la cuve de transfert lors d'une troisième campagne de production. Pointillés : seuil de détection.....	141
Figure 42 Fate of <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a CIP 104794 (○), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 100720T (Δ), <i>Salmonella enterica enterica</i> Typhimurium CIP 104115 (▲), and <i>Burkholderia lata</i> DSM 23089 (●) in orange blossom hydrosol (A) and rose flower hydrosol (B) at 30°C Bars represent standard deviation, (n= 3) and may be hidden by key-symbols when small. Dotted line: detection limit.	163
Figure 43 Ability of hydrosol strains to grow in PCB10 medium at different pH after 12 days incubation at 30°C. <i>P. protegens</i> IA_RC_09 ; <i>P. veronii</i> IA_RC_05 ; <i>P. panacis</i> IA_RC_13; <i>B. ambifaria</i> IA_FO_08; <i>B. lata</i> IA_RC_17; <i>B. lata</i> IA_FO_15; <i>B. vietnamiensis</i> IA_FO_09.	166
Figure 44 Maximal population density expressed as maximal A_{600} after 48h incubation at 30°C under agitation 200 rpm in PCB10, example of <i>Pseudomonas protegens</i> IA_RC_09 (○) and <i>Burkholderia lata</i> IA_RC_17 (●) submitted to different concentrations of preservatives, plant extracts, or organic acids. A: 2-phenoxyethanol; B: benzyl alcohol; C : green tea extract 90% polyphenols; D: citric acid at pH=5. Arrows indicate MIC.	168

Figure 45 : Maximal population density expressed as maximal A_{600} after 48h incubation at 30°C under agitation 200 rpm in PCB10 of <i>Pseudomonas</i> and <i>Burkholderia</i> strains isolated from hydrosols, subjected to different concentrations of sodium benzoate (●) and potassium sorbate (○) alone, and in combination (▲).....	170
Figure 46: Fate of mixture of strains isolated from hydrosol in orange blossom hydrosol (A, B) and rose flower hydrosol (C, D) containing benzyl alcohol at 0 g/L (●), 1 g/L (○), and 5 g/L (▲) incubated at 5°C and 30°C (A, C) and 5°C (B, D). Dotted line: detection limit.	172
Figure 47 Effet de l'extrait de romarin sur les souches isolées d'hydrolats. Cet extrait est utilisé comme substrat de croissance par les souches bactériennes testées.	175
Figure 48 Effet de 4 antimicrobiens dans du milieu PCB300 et dans les hydrolats (<i>Rosa centifolia</i> et <i>Citrus aurantium</i>) sur un mélange de 7 souches isolées des hydrolats (<i>P. protegens</i> IA_RC_09 ; P2 : <i>P. veronii</i> IA_RC_05 ; P3 : <i>P. panacis</i> IA_RC_13; B1: <i>B. ambifaria</i> IA_FO_08; B2: <i>B. lata</i> IA_RC_17; B3: <i>B. lata</i> IA_FO_15; B4: <i>B. vietnamiensis</i> IA_FO_09), mélangées à concentration égales, incubées à 30°C ou 5°C sous agitation 200 rpm pendant un période minimale de 15 jours. n=3 réplicats. Rouge/en haut : incubation à 30°C ; Bleu/en bas : incubation à 5°C. Ronds plein : effet inhibiteur ; Ronds vides : pas d'inhibition observée à cette concentration.	178
Figure 49 Evolution de la population bactérienne de trois échantillons d'eau de fleur d'oranger (#6.2, #7.2, et #8.2) en fonction du temps de stockage à température ambiante et leur changement d'aspect au cours du temps.	189
Figure 50 Test de viabilité Live/Dead sur l'eau de fleur d'oranger #8.2 (G x1000). A : fluorescence du SYTO 9 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 485/498). B : fluorescence de l'iodure de propidium ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 533/617). Les cercles orange représentent les cellules viables, apparaissant en A et n'apparaissant pas en B.	189

Liste des tableaux :

Tableau 1 Proportion des composés volatils majoritaires dans l'eau de fleur d'oranger et l'huile essentielle, le néroli.	34
Tableau 2 Solubilité des composés volatils retrouvés dans l'eau de rose bulgare (<i>Rosa damascena</i>) et l'huile essentielle.	35
Tableau 3 Notes aromatiques des principaux composés des huiles essentielles pouvant être métabolisés par les microorganismes, ainsi que leurs produits de métabolisation.	45
Tableau 4 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les eaux minérales	59
Tableau 5 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les eaux en bouteilles issues de sources municipales stérilisées et désinfectées aux Etats-Unis et Canada.	60
Tableau 6 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les eaux aromatisées en bouteille60	60
Tableau 7 : Microorganismes capables de se multiplier ou de survivre dans les boissons non-alcoolisées, non gazeuse, et contenant du jus de fruit.....	61
Tableau 8 Structure chimique des catéchines d'intérêt	80
Tableau 9 Caractéristiques biochimiques qui différencient <i>Pseudomonas migulae</i> et <i>P. panacis</i> ; <i>P. veronii</i> et <i>P. extremorientalis</i> ; <i>Burkholderia lata</i> , <i>B. cepacia</i> et <i>B. vietnamiensis</i> ; <i>B. lata</i> et <i>B. ambifaria</i> ; <i>B. lata</i> et <i>B. cepacia</i> ; <i>B. lata</i> , <i>B. cepacia</i> , et <i>B. multivorans</i> (Vanlaere, Baldwin <i>et al.</i> 2009) (Ivanova, Gorshkova <i>et al.</i> 2002; Park, Lee <i>et al.</i> 2005).....	103
Tableau 10 Dénombrement des bactéries aérobies de 4 échantillons d'hydrolats sous différentes conditions de pH, de température, et de dilution du milieu de culture PCA.....	112

Tableau 11 Description of orange blossom (<i>Citrus aurantium</i>), rose D. (<i>Rosa damascena</i>), and rose C. (<i>Rosa centifolia</i>) hydrosol samples	123
Tableau 12 Essential oil concentrations and area percentages of 31 volatile compounds of orange blossom (<i>Citrus aurantium</i>), rose D. (<i>Rosa damascena</i>), and rose C. (<i>Rosa centifolia</i>) hydrosols, and comparison with literature and industrial data.	131
Tableau 13 Composition, pH of, and bacterial counts in orange blossom (<i>Citrus aurantium</i>), rose D. (<i>Rosa Damascena</i>), and rose C. (<i>Rosa centifolia</i>) hydrosols from diverse origins and stored in different conditions	132
Tableau 14: Identification of hydrosol bacteria.	138
Tableau 15 Concentration en composés et métabolites non-volatils, métabolisés ou produits par les microorganismes présents dans l'eau de fleur d'oranger (n=8).....	143
Tableau 16 Concentration en composés et métabolites non-volatils, métabolisés ou produits par les microorganismes présents dans l'eau de rose de mai (n=8).....	144
Tableau 17 Analyse de l'espace de tête de deux échantillons d'eau de fleur d'oranger stockés à 5°C (#7.1 et #8.1) et à température ambiante (environ 21°C) (#7.2, et #8.2), et de deux échantillon d'eau de rose de mai stockés à 5°C (#18.1 et #21.1) et à température ambiante (#18.2 et #21.2). Aire des pics chromatographiques (x 10000 uA). (n=1)	146
Tableau 18 Main characteristics of preservatives and plant extracts used in this study.....	159
Tableau 19 Changes in bacteria populations of reference spoilage and pathogenic bacteria, and of strains isolated from hydrosols after 144h incubation at 30°C in hydrosols. Expressed in log ₁₀ (CFU/mL). n=3.	164
Tableau 20 Changes in bacterial populations of seven hydrosol strains in PCB300 after a 12-day incubation at 5°C and 30°C. mean ± standard deviation (n=3).....	165
Tableau 21 : Minimal inhibitory concentrations (g/L) of various antimicrobials and potential antimicrobial compounds on three <i>Pseudomonas</i> sp. and four <i>Burkholderia</i> sp. strains isolated from orange blossom and rose hydrosols, after 48h incubation at 30°C, under agitation 200 rpm. P1: <i>P. protegens</i> IA_RC_09 ; P2 : <i>P. veronii</i> IA_RC_05 ; P3 : <i>P. panacis</i> IA_RC_13; B1: <i>B. ambifaria</i> IA_FO_08; B2: <i>B. lata</i> IA_RC_17; B3: <i>B. lata</i> IA_FO_15; B4: <i>B. vietnamiensis</i> IA_FO_09; Pa1: <i>P. aeruginosa</i> CIP 100720T; Pa2: <i>P. aeruginosa</i> CIP 107832; Pa3: <i>P. aeruginosa</i> CIP 82.118; Pa4: <i>P. aeruginosa</i> CIP 76.110.	169
Tableau 22 Changes in counts of a bacterial inoculum made of 3 <i>Pseudomonas</i> sp. strains and 4 <i>Burkholderia</i> sp. strains isolated from hydrosols, mixed at equal concentrations and then submitted to various antimicrobials and potential antimicrobial compounds, inoculated in orange blossom (<i>Citrus aurantium</i>) and rose flower (<i>Rosa centifolia</i>) hydrosols, stored at 5°C and 30°C during 3 months. (mean ± standard deviation of n=3 replicates)	173
Tableau 23 Accroissement maximal ou réduction de la population bactérienne (log ₁₀ UFC/mL) après 15 jours d'incubation à 30°C ou 5°C sous agitation 200 rpm d'un inoculum de 3 log ₁₀ UFC/mL, composé d'un mélange des 7 souches isolées des hydrolats (<i>P. protegens</i> IA_RC_09 ; P2 : <i>P. veronii</i> IA_RC_05 ; P3 : <i>P. panacis</i> IA_RC_13; B1: <i>B. ambifaria</i> IA_FO_08; B2: <i>B. lata</i> IA_RC_17; B3: <i>B. lata</i> IA_FO_15; B4: <i>B. vietnamiensis</i> IA_FO_09), mélangées à concentration égales puis soumises à différents antimicrobiens potentiels dans un milieu de culture PCB300 (moyenne ± écart type de n=3 réplicats).	176
Tableau 24 Absorbance à λ=600nm (A ₆₀₀) des trois échantillons d'eau de fleur d'oranger (#6.2, #7.2, et #8.2) dès leur réception au laboratoire, entre 3 et 10 jours après leur distillation, puis après 68 jours de stockage à température ambiante.	189
Photographie 1 Boutons de fleur d'oranger étendues sur le sol 24h avant distillation. Photographie : C. Labadie - Albert Vieille SAS	24

Photographie 2 (à gauche) et 3 (à droite) : Alambic, vue d'ensemble à gauche, intérieur de la cuve de distillation à droite. A : Cuve de distillation; B : Réfrigérant ; C : essencier ; D : Première cuve de stockage avant pasteurisation. <i>Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS</i>	25
Photographie 4 (à gauche) : Le pasteurisateur en E et la cuve de transfert en F. Photographie 5 (à droite) : cubitainers de capacité 1000L. <i>Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS</i>	25
Photographie 6 : Prélèvement d'eau de fleurs d'oranger. <i>Photographie : C. Labadie – Albert Vieille SAS</i>	26
Photographie 7 (à gauche): cuves de distillation. Photographie 8 (à droite): système de chauffe d'une cuve de distillation (tubulure). <i>Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS</i>	26
Photographie 9 (à gauche): système de refroidissement d'eau du réfrigérant. Photographie 10 (à droite): cuves de stockage 200 L. <i>Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS</i>	27
Photographie 11 (à gauche) : cueillette de la rose de mai dans un sac en toile de jute. <i>Photographie : Albert Vieille SAS</i> . Photographie 12 (à droite) : cuve de distillation avec la grille sur laquelle on dépose les roses fraîches en vue de la distillation. <i>Photographie : C. Labadie – Albert Vieille SAS</i>	27
Photographie 13 (à gauche) : réfrigérant. Photographie 14 (à droite) : A : essencier dans lequel sont séparés l'hydrolat et l'huile essentielle ; B : cuve de transfert munie d'un entonnoir. <i>Photographies : C. Labadie – Albert Vieille SAS</i>	28

9. Références bibliographiques

- Adams, M. R. and C. J. Hall (1988). "Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures." International Journal of Food Science & Technology **23**(3): 287-292.
- AFNOR (2014). Matières premières aromatiques naturelles -- Vocabulaire. ISO 9235:2014. AFNOR.
- Agarwal, S. G., A. Gupta, *et al.* (2005). "Chemical composition of rose water volatiles." Journal of Essential Oil Research **17**(3): 265-267.
- Ahmed, W., R. Yusuf, *et al.* (2013). "Fecal indicators and bacterial pathogens in bottled water from Dhaka, Bangladesh." Brazilian Journal of Microbiology **44**(1): 97-103.
- Ait-Ouazzou, A., L. Cherrat, *et al.* (2011). "The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation." Innovative Food Science & Emerging Technologies **12**(3): 320-329.
- Ait Tayeb, L., E. Ageron, *et al.* (2005). "Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates." Research in Microbiology **156**(5-6): 763-773.
- Al-Turki, A. I. (2007). "Antibacterial effect of thyme, peppermint, sage, black pepper and garlic hydrosols against *Bacillus subtilis* and *Salmonella enteritidis*." Journal of Food Agriculture & Environment **5**(2): 92-94.
- Allen, M. J., S. C. Edberg, *et al.* (2004). "Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water?" International Journal of Food Microbiology **92**(3): 265-274.
- Ammar, A. H., J. Bouajila, *et al.* (2012). "Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* l. flowers essential oil (Neroli oil)." Pakistan journal of biological sciences: PJBS **15**(21): 1034-1040.
- Andrès, E. and J. L. Dimarcq (2007). "Peptides antimicrobiens cationiques: de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. Mise à jour." Médecine et Maladies Infectieuses **37**(4): 194-199.
- Anisimova, M., M. Gil, *et al.* (2011). "Survey of Branch Support Methods Demonstrates Accuracy, Power, and Robustness of Fast Likelihood-based Approximation Schemes." Systematic Biology **60**(5): 685-699.
- Anselmi, C., A. Ettore, *et al.* (2002). "In vitro induction of apoptosis vs. necrosis by widely used preservatives: 2-phenoxyethanol, a mixture of isothiazolinones, imidazolidinyl urea and 1,2-pentanediol." Biochemical Pharmacology **63**(3): 437-453.
- ANSM (2012) "Eaux distillées végétales et eaux aromatisées végétales." Pharmacopée française 11e edition.
- ANSM (2012). Pharmacopée française 11e edition, ANSM.
- Armas, A. B. and J. P. Sutherland (1999). "A survey of the microbiological quality of bottled water sold in the UK and changes occurring during storage." International Journal of Food Microbiology **48**(1): 59-65.
- Aronov, E. V. and L. Clark (1996). "Degradation studies of the non-lethal bird repellent, methyl anthranilate." Pesticide Science **47**(4): 355-362.
- Aslam Khan, M. and R. Shoaib Ur (2005). "Extraction and analysis of essential oil of *Rosa* species." International Journal of Agriculture and Biology **7**(6): 973-974.
- Babu, K. G. D., B. Singh, *et al.* (2002). "Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures." Flavour and Fragrance Journal **17**(2): 136-140.
- Back, W., I. Bohak, *et al.* (1999). "*Lactobacillus perolens* sp. nov., a soft drink spoilage bacterium." Systematic and Applied Microbiology **22**(3): 354-359.

- Bahadori, A. and H. B. Vuthaluru (2010). "Prediction of silica carry-over and solubility in steam of boilers using simple correlation." Applied Thermal Engineering **30**(2–3): 250-253.
- Bajpai, V. K., K.-H. Baek, *et al.* (2012). "Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review." Food Research International **45**(2): 722-734.
- Bakkali, F., S. Averbeck, *et al.* (2008). "Biological effects of essential oils - A review." Food and Chemical Toxicology **46**(2): 446-475.
- Bansal, S., S. Choudhary, *et al.* (2013). "Tea: A native source of antimicrobial agents." Food Research International **53**(2): 568-584.
- Baydar, H., H. Kuleasan, *et al.* (2013). "The Effects of Pasteurization, Ultraviolet Radiation and Chemical Preservatives on Microbial Spoilage and Scent Composition of Rose Water." Journal of Essential Oil Bearing Plants **16**(2): 151-160.
- Baydar, H., H. Schulz, *et al.* (2008). "Influences of fermentation time, hydro-distillation time and fractions on essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.)." Journal of Essential Oil Bearing Plants **11**(3): 224-232.
- Beales, N. (2004). "Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **3**(1): 1-20.
- Bellahsene, C., M. Bendahou, *et al.* (2015). "Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil and hydrosol extract of *Nepeta nepetella* subsp. *amethystina* (Poir.) Briq. from Algeria." Journal of Applied Pharmaceutical Science **5**(9): 021-025.
- Bergfeld, W. F., D. V. Belsito, *et al.* (2012). "Safety assessment of chlorphenesin as used in cosmetics." Cosmetic Ingredient Review.
- Bergsma, J. and W. N. Konings (1983). "The properties of citrate transport in membrane-vesicles from *Bacillus subtilis*." European Journal of Biochemistry **134**(1): 151-156.
- Bernardes, W. A., R. Lucarini, *et al.* (2010). "Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol." Chemistry & Biodiversity **7**(7): 1835-1840.
- Beuchat, L. R. (1981). "Synergistic effects of potassium sorbate and sodium benzoate on thermal inactivation of yeasts." Journal of Food Science **46**(3): 771-777.
- Bharath, J., M. Mosodeen, *et al.* (2003). "Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad." International Journal of Food Microbiology **81**(1): 53-62.
- Bischofberger, T., S. K. Cha, *et al.* (1990). "The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles." International Journal of Food Microbiology **11**(1): 51-71.
- Blake, P. A., M. L. Rosenberg, *et al.* (1977). "Cholera in Portugal, 1974 .2. Transmission by bottled mineral water." American Journal of Epidemiology **105**(4): 344-348.
- Boberg, J., C. Taxvig, *et al.* (2010). "Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites." Reproductive Toxicology **30**(2): 301-312.
- Bock, G., I. Benda, *et al.* (1988). "Microbial transportation of geraniol and nerol by *Botrytis cinerea*." Applied Microbiology and Biotechnology **27**(4): 351-357.
- Boman, H. G. (2003). "Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts." Journal of Internal Medicine **254**(3): 197-215.
- Bonaccorsi, I., D. Sciarrone, *et al.* (2011). "Composition of Egyptian Neroli Oil." Natural Product Communications **6**(7): 1009-1014.
- Bourrain, J. L. (2013). "Allergies aux huiles essentielles : aspects pratiques." Revue Française d'Allergologie **53**, **Supplement 1**: 30-32.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, *et al.* (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." LWT - Food Science and Technology **28**(1): 25-30.

- Branger, A. (2012). Microbiochimie et alimentation, Educagri.
- Brannan, D. K. (1997). Cosmetic microbiology: a practical handbook, Taylor & Francis.
- Brodkorb, D., M. Gottschall, *et al.* (2010). "Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes." The Journal of Biological Chemistry **285**(40): 30436-30442.
- Brul, S. and P. Coote (1999). "Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms." International Journal of Food Microbiology **50**(1-2): 1-17.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review." International Journal of Food Microbiology **94**(3): 223-253.
- Burt, S. A. and R. D. Reinders (2003). "Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7." Letters in Applied Microbiology **36**(3): 162-167.
- Cabral, D. and V. E. Fernández Pinto (2002). "Fungal spoilage of bottled mineral water." International Journal of Food Microbiology **72**(1-2): 73-76.
- Calo, J. R., P. G. Crandall, *et al.* (2015). "Essential oils as antimicrobials in food systems – A review." Food Control **54**: 111-119.
- Cantwell, S. G., E. P. Lau, *et al.* (1978). "Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species." Journal of Bacteriology **135**(2): 324-333.
- Carter, J. T., E. W. Rice, *et al.* (2000). "Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system." Water Research **34**(5): 1495-1502.
- Casanovas-Massana, A. and A. R. Blanch (2012). "Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters." International Journal of Food Microbiology **153**(1-2): 38-44.
- CH4 service - Analyse de l'eau. (2010). "Quelques compositions d'eaux minérales en bouteille." Retrieved 2015-07-10, 2015, from www.ch4service.fr/science/analyses/tableaux-eaux-minerales.pdf.
- Chambre Syndicale des Eaux Minérales. (2014). "Qualité de l'eau minérale naturelle." Retrieved 2015-08-12, 2015, from <http://eaumineralnaturelle.fr/qualite/qualite-de-leau-minerale>.
- Chen, X. M., H. Kobayashi, *et al.* (2011). "Functional characterization of rose phenylacetaldehyde reductase (PAR), an enzyme involved in the biosynthesis of the scent compound 2-phenylethanol." Journal of Plant Physiology **168**(2): 88-95.
- Chen, Y. S., S. C. Chen, *et al.* (2003). "Effects of soil pH, temperature and water content on the growth of *Burkholderia pseudomallei*." Folia Microbiologica **48**(2): 253-256.
- Cheung, S. and J. Tai (2007). "Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*." Oncology Reports **17**(6): 1525-1531.
- Chiou, R. Y.-Y., R. D. Phillips, *et al.* (2004). "Ethanol-mediated variations in cellular fatty acid composition and protein profiles of two genotypically different strains of *Escherichia coli* O157:H7." Applied and Environmental Microbiology **70**(4): 2204-2210.
- Chorianopoulos, N. G., E. D. Giaouris, *et al.* (2008). "Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers." Journal of Applied Microbiology **104**(6): 1586-1596.
- Chun-Hoong, H., I. Noryati, *et al.* (2010). "In vitro antibacterial and antioxidant activities of *Orthosiphon stamineus* Benth. extracts against food-borne bacteria." Food Chemistry **122**(4): 1168-1172.
- CNRS. "Dossier scientifique: L'eau - Eau potable." Retrieved 2015-08-12, from <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/potable/menuRessour.html>.

- Concina, I., M. Bornšek, *et al.* (2010). "*Alicyclobacillus spp.*: detection in soft drinks by electronic nose." Food Research International **43**(8): 2108-2114.
- Cooper, J. R. (2008). Procedures for the measurement of carryover of boiler water into steam. Technical Guidance Document. T. I. A. f. t. P. o. W. a. Steam. Berlin, Germany.
- Corre, J., J. J. Lucchini, *et al.* (1990). "Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations." Research in Microbiology **141**(4): 483-497.
- Cosandey, J. O. and P. R. von Rohr (2001). "Entrainment of soluble and non soluble tracers from a boiling water surface." Nuclear Engineering and Design **208**(1): 87-97.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, *et al.* (1999). "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils." Letters in Applied Microbiology **29**(2): 130-135.
- Council of Europe (2014). European Pharmacopoeia, 8th edition. E. d. f. t. q. o. m. healthcare, European directorate for the quality of medicines & healthcare.
- Craig, J. O. (1953). "Poisoning by the volatile oils in childhood." Archives of disease in childhood **28**(142): 475-483.
- Cushnie, T. P. T. and A. J. Lamb (2011). "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids." International Journal of Antimicrobial Agents **38**(2): 99-107.
- Cvetnic, Z. and S. Vladimir-Knezevic (2004). "Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract." Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia) **54**(3): 243-250.
- Daglia, M. (2012). "Polyphenols as antimicrobial agents." Current Opinion in Biotechnology **23**(2): 174-181.
- Davidson, P. M., J. N. Sofos, *et al.* (2005). Antimicrobials in food, third edition, Taylor & Francis group.
- De Reynal, B. (2009). Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires (4e ed.), Lavoisier.
- Del Campo, J., M. J. Amiot, *et al.* (2000). "Antimicrobial effect of rosemary extracts." Journal of Food Protection **63**(10): 1359-1368.
- DEMEB - département de toxicologie (2011). Concept paper : le sequençage a haut debit, methodes et enjeux en medecine, pharmacologie et toxicologie. Saint-Denis, France, ANSM.
- Demyttenaere, J. C. R. (2001). Biotransformation of terpenoids by microorganisms. Studies in natural products chemistry. Elsevier. Oxford, Elsevier. **25**: 125-178.
- Dewick, P. M. (1995). "The biosynthesis of C5-C20 terpenoid compounds." Natural Product Reports **12**(5): 507-534.
- Douterelo, I., J. B. Boxall, *et al.* (2014). "Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems." Water Research **65**: 134-156.
- Dubois-Brissonnet, F., M. Naïtali, *et al.* (2011). "Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by plant-derived terpenes." Applied and Environmental Microbiology **77**(3): 906-910.
- Dubois, M., K. A. Gilles, *et al.* (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." Analytical Chemistry **28**(3): 350-356.
- Dugo, G. and L. Mondello (2010). Citrus oils: composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity, CRC Press.
- Dunn, W. B., D. Broadhurst, *et al.* (2011). "Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry." Nature Protocols **6**(7): 1060-1083.

- Dunnett, P. C. and G. M. Telling (1984). "Study of the fate of Bronopol and the effects of antioxidants on N-nitrosamine formation in shampoos and skin creams." International Journal of Cosmetic Science **6**(5): 241-247.
- Dunphy, P. J. (2006). "Location and biosynthesis of monoterpenyl fatty acyl esters in rose petals." Phytochemistry **67**(11): 1110-1119.
- Edberg, S. C., P. Gallo, *et al.* (1996). "Analysis of the virulence characteristics of bacteria isolated from bottled, water cooler, and tap water." Microbial Ecology in Health and Disease **9**(2): 67-77.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Research **32**(5): 1792-1797.
- EFSA, C. s. (2006). "Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments à la demande de la Commission concernant l'utilisation de la nisine (E 234) en tant qu'additif alimentaire - Question numéro EFSA-Q-2005-031." European Food Safety Authority.
- Eklund, T. (1985). "Inhibition of microbial-growth at different ph levels by benzoic and propionic acids and esters of para-hydroxybenzoic acid." International Journal of Food Microbiology **2**(3): 159-167.
- Ellouze, I., H. Debbabi, *et al.* (2010). Study of composition variation of different distillate fractions of *Citrus aurantium* L. obtained by steam distillation. Acta Horticulturae. M. Neffati, A. O. Belgacem and M. El-Mourid: 183-188.
- Elomari, M., L. Coroler, *et al.* (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.
- Erkan, N., G. Ayranci, *et al.* (2008). "Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol." Food Chemistry **110**(1): 76-82.
- European Parliament & Council of European Union (2009). "Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters" Official Journal of the European Union(164): p. 45–58.
- Falcy, M. and S. Malard (2005). "Comparaison des seuils olfactifs de substances chimiques avec des indicateurs de sécurité utilisés en milieu professionnel." INRS - Hygiène et sécurité au travail - Cahier des notes documentaires **198**.
- Félice, F. B. (1773). Encyclopédie, ou dictionnaire universel raisonné des connoissances humaines: Jan - Inv.
- Fernandez, X., C. André, *et al.* (2014). Hydrolats et eaux florales: vertus et applications. Paris, Vuibert.
- Ferreira-Tonin, M., J. Rodrigues-Neto, *et al.* (2012). "Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **62**: 1419-1424.
- Fewtrell, L., D. Kay, *et al.* (1997). "Microbiological quality of bottled water." Water Science and Technology **35**(11–12): 47-53.
- Fisher, K. and C. Phillips (2008). "Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is *Citrus* the answer?" Trends in Food Science & Technology **19**(3): 156-164.
- Flaman, Z., S. Pellechia-Clarke, *et al.* (2001). "Unintentional exposure of young children to camphor and eucalyptus oils." Paediatrics & Child Health **6**(2): 80-83.
- Förster-Fromme, K., B. Höschle, *et al.* (2006). "Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology **72**(7): 4819-4828.

- Fried, V. A. and A. Novick (1973). "Organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12." Journal of Bacteriology **114**(1): 239-248.
- Frutos, P., S. Torrado, *et al.* (2000). "A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **21**(6): 1149-1159.
- Garrity, G. M., D. J. Brenner, *et al.* (2001). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology - Volume 2 - The Proteobacteria - Part C - The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Springer.
- Gascuel, O. (1997). "BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data." Molecular Biology and Evolution **14**(7): 685-695.
- Gottig, N., M. E. Pedrido, *et al.* (2005). "The *Bacillus subtilis* SinR and RapA developmental regulators are responsible for inhibition of spore development by alcohol." Journal of Bacteriology **187**(8): 2662-2672.
- Gradišar, H., P. Pristovšek, *et al.* (2007). "Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with Its ATP binding site." Journal of Medicinal Chemistry **50**(2): 264-271.
- Gu, J., P. Xu, *et al.* (2002). "A biocatalyst for pyruvate preparation from dl-lactate: lactate oxidase in a *Pseudomonas* sp." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **18**(4-6): 299-305.
- Gu, Y. H. and M. Mazzola (2001). "Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8." Soil Biology & Biochemistry **33**(9): 1155-1162.
- Guindon, S., J. F. Dufayard, *et al.* (2010). "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." Systematic Biology **59**: 307-321.
- Guinebretiere, M. H., O. Berge, *et al.* (2001). "Identification of bacteria in pasteurized zucchini purees stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees." Applied and Environmental Microbiology **67**(10): 4520-4530.
- Guinebretiere, M. H. and C. Nguyen-The (2003). "Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods." FEMS Microbiology Ecology **43**(2): 207-215.
- Gustafson, Liew, *et al.* (1998). "Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*." Letters in Applied Microbiology **26**(3): 194-198.
- Gutiérrez-Larraínzar, M., J. Rúa, *et al.* (2012). "Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria." Food Control **26**(2): 555-563.
- Gutierrez-Larrainzar, M., J. Rúa, *et al.* (2013). "In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*." Food Control **30**(2): 393-399.
- Hagvall, L., C. Bäcktorp, *et al.* (2007). "Fragrance compound geraniol forms contact allergens on air exposure. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization." Chemical Research in Toxicology **20**(5): 807-814.
- Hajlaoui, H., F. Ben Abdallah, *et al.* (2010). "Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy." African Journal of Microbiology Research **4**(11): 1122-1127.
- Harvey, M., G. Cave, *et al.* (2010). "Fatal methaemoglobinaemia induced by self-poisoning with sodium nitrite." Emergency Medicine Australasia **22**(5): 463-465.
- Hatano, T., M. Tsugawa, *et al.* (2008). "Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid." Phytochemistry **69**(18): 3111-3116.

- Helander, I. M., H. L. Alakomi, *et al.* (1998). "Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(9): 3590-3595.
- Herbert, R. B. (2012). The biosynthesis of secondary metabolites, Springer Netherlands.
- Heydarynia, A., M. Veissi, *et al.* (2011). "A comparative study of the effects of the two preservatives, sodium benzoate and potassium sorbate on *Aspergillus niger* and *Penicillium notatum*." Jundishapur J Microbiol **4**(4): 0-0.
- Hirata, H., T. Ohnishi, *et al.* (2012). "Functional characterization of aromatic amino acid aminotransferase involved in 2-phenylethanol biosynthesis in isolated rose petal protoplasts." Journal of Plant Physiology **169**(5): 444-451.
- Höschle, B. and D. Jendrossek (2005). "Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol." Microbiology **151**(7): 2277-2283.
- Huang, Y., M. Wilson, *et al.* (2010). "Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems." Food Microbiology **27**(1): 33-36.
- Ikigai, H., T. Nakae, *et al.* (1993). "Bactericidal catechins damage the lipid bilayer." Biochimica Et Biophysica Acta **1147**(1): 132-136.
- Ivanova, E. P., N. M. Gorshkova, *et al.* (2002). "*Pseudomonas extremorientalis* sp. nov., isolated from a drinking water reservoir." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**(6): 2113-2120.
- Jeannot, V., J. Chahboun, *et al.* (2005). "Quantification and determination of chemical composition of the essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium*)." International Journal of Aromatherapy **15**(2): 94-97.
- Jeon, J., J. H. Kim, *et al.* (2014). "The antimicrobial activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate and green tea extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolated from skin wounds." Annals of Dermatology **26**(5): 564-569.
- Joglekar, S. S. and R. S. Dhavlikar (1969). "Microbial transformation of terpenoids. I. Identification of metabolites produced by a *Pseudomonad* from citronellal and citral." Applied Microbiology **18**(6): 1084-1087.
- Jones, A. Q., S. E. Majowicz, *et al.* (2007). "Drinking water consumption patterns in British Columbia: An investigation of associations with demographic factors and acute gastrointestinal illness." Science of the Total Environment **388**(1-3): 54-65.
- Jones, C. R., M. R. Adams, *et al.* (1999). "The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles." Journal of Applied Microbiology **86**(6): 917-927.
- Joshitope, G. and A. J. Francis (1995). "Mechanisms of biodegradation of metal-citral complexes by *Pseudomonas fluorescens*." Journal of Bacteriology **177**(8): 1989-1993.
- Jung-Sook, S. and C. Ha-Sook (2007). "Antibacterial activities of phenolic components from *Camellia sinensis* L. on pathogenic microorganisms." Journal of Food Science and Nutrition **12**(3): 135-140.
- Kakinuma, A. and S. Yamatodani (1964). "L-Glutamic Acid Formation from 2-Furoic Acid by Soil Bacteria." Nature **201**(4917): 420-421.
- Kazemi, M., S. Zamani, *et al.* (2011). "Effect of some treatment chemicals on keeping quality and vase-life of gebrera cut flowers." American Journal of Plant Physiology **6**(2): 99-105.
- KEGG (2015). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
- Kerr, M., M. Fitzgerald, *et al.* (1999). "Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 in bottled natural mineral water." Journal of Applied Microbiology **87**(6): 833-841.

- Kier, L. B., C. K. Cheng, *et al.* (1998). "A cellular automata model of acid dissociation." Journal of Chemical Information and Computer Sciences **38**(2): 271-275.
- Kim, S.-Y., D.-H. Kang, *et al.* (2011). "Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce." Journal of Food Science **76**(1): M41-M46.
- Kireche, M., J.-L. Peiffer, *et al.* (2011). "Evidence for chemical and cellular reactivities of the formaldehyde releaser Bronopol, independent of formaldehyde release." Chemical Research in Toxicology **24**(12): 2115-2128.
- Krebs, H. A., D. Wiggins, *et al.* (1983). "Studies on the mechanism of the anti-fungal action of benzoate." Biochemical Journal **214**(3): 657-663.
- Kregiel, D. (2015). "Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms." Biomed Research International.
- Kregiel, D., A. Rygala, *et al.* (2012). "*Asaia lannensis*—the spoilage acetic acid bacteria isolated from strawberry-flavored bottled water in Poland." Food Control **26**(1): 147-150.
- Labadie, C., C. Ginies, *et al.* (2015). "Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota." Food Research International **76, Part 3**: 576-586.
- Lamarti, A., A. Badoc, *et al.* (1994). "Biogénèse des monoterpènes. III: Monoterpènes synthétases." Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux **133**(1-2): 100-118.
- Larrosa, M., P. Truchado, *et al.* (2012). "Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) adhesion to human alveolar epithelial cells A549 using SYTO 9 dye." Molecular and Cellular Probes **26**(3): 121-126.
- Le Marc, Y., V. Huchet, *et al.* (2002). "Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration." International Journal of Food Microbiology **73**(2-3): 219-237.
- Lee, E., S. S. An, *et al.* (2007). "Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives." Contact Dermatitis **56**(3): 131-136.
- Lee, J.-C. and K.-S. Whang (2015). "*Burkholderia humisilvae* sp. nov., *Burkholderia solisilvae* sp. nov. and *Burkholderia rhizosphaerae* sp. nov., isolated from forest soil and rhizosphere soil." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
- Legnani, P., E. Leoni, *et al.* (1999). "Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study." International Journal of Food Microbiology **53**(2-3): 153-158.
- Leifson, E. (1962). "The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Ppirillum* and *Pseudomonas*." International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy **12**(4): 161-170.
- Leitão, J., S. Sousa, *et al.* (2010). "Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species." Applied Microbiology and Biotechnology **87**(1): 31-40.
- Lemos, M., A. Borges, *et al.* (2014). "The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms." International Biodeterioration & Biodegradation **86, Part A**(0): 42-51.
- Liu, X., J. Li, *et al.* (2012). "Exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to green tea polyphenols enhances the tolerance to various environmental stresses." World Journal of Microbiology and Biotechnology **28**(12): 3373-3380.
- Lopez-Romero, J. C., H. Gonzalez-Rios, *et al.* (2015). "Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM **2015**: 795435-795435.

- Lou, M.-m., L.-x. Zhang, *et al.* (2007). "Genomovars of *Burkholderia cepacia* complex from rice rhizosphere and clinic in China." Rice Science **14**(3): 229-234.
- Luck, E. and M. Jager (1997). Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects, Springer.
- Lüddecke, F., A. Wülfing, *et al.* (2012). "Geraniol and geraniol dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*." Applied and Environmental Microbiology **78**(7): 2128-2136.
- Lund, B. M. and T. Eklund (2000). Control of pH and use of organic acids. The microbiological safety and quality of food. B. M. Lund, T. A. C. Baird-Parker and G. W. Gould. Gaithersburg, Maryland, U.S, Aspen Publishers, Inc. **Vol. 1**.
- Lundov, M. D., J. D. Johansen, *et al.* (2011). "Low-level efficacy of cosmetic preservatives." International Journal of Cosmetic Science **33**(2): 190-196.
- Lundov, M. D., T. Krongaard, *et al.* (2011). "Methylisothiazolinone contact allergy: a review." British Journal of Dermatology **165**(6): 1178-1182.
- Madyastha, K. M. (1984). "Microbial transformations of acyclic monoterpenes." Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Chemical Sciences **93**(4): 677-686.
- Madyastha, K. M. and T. L. Gururaja (1993). "A new pathway for the degradation of a sesquiterpene alcohol, nerolidol by *Alcaligenes eutrophus*." Biochemical and Biophysical Research Communications **193**(1): 26-31.
- Magnard, J.-L., A. Rocca, *et al.* (2015). "Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses." Science **349**(6243): 81-83.
- Mahboubifar, M., S. Shahabipour, *et al.* (2014). "Evaluation of the valuable oxygenated components in Iranian rose water." International Journal of ChemTech Research **6**(11): 7.
- Mahenthalingam, E. and P. Vandamme (2005). "Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex." Chronic Respiratory Disease **2**(4): 209-217.
- Maitre, M., S. Weidmann, *et al.* (2014). "Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity." Applied and Environmental Microbiology **80**(10): 2973-2980.
- Marino, M., C. Bersani, *et al.* (2001). "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*." International Journal of Food Microbiology **67**(3): 187-195.
- Marmulla, R. and J. Harder (2014). "Microbial monoterpene transformations - a review." Frontiers in microbiology **5**.
- Massa, S., C. Altieri, *et al.* (2001). "The occurrence of *Aeromonas spp.* in natural mineral water and well water." International Journal of Food Microbiology **63**(1-2): 169-173.
- Mazzola, P. G., A. M. S. Martins, *et al.* (2006). "Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system." BMC Infectious Diseases **6**(131): (16 August 2006).
- McBride, C. S., F. Baier, *et al.* (2014). "Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor." Nature **515**(7526): 222-227.
- Mencherini, T., P. Picerno, *et al.* (2007). "Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*." Journal of Natural Products **70**(12): 1889-1894.
- Meyer, B. K., A. Ni, *et al.* (2007). "Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present." Journal of Pharmaceutical Sciences **96**(12): 3155-3167.
- Michaud, D. S., M. Kogevinas, *et al.* (2007). "Total Fluid and Water Consumption and the Joint Effect of Exposure to Disinfection By-Products on Risk of Bladder Cancer." Environmental Health Perspectives **115**(11): 1569-1572.
- Michel, A.-S. (2010). A la découverte des peptides antimicrobiens. Faculté de pharmacie Nancy 1, Université Henri Poincaré.

- Moore, J. E., M. McCalmont, *et al.* (2002). "Asaia sp., an unusual spoilage organism of fruit-flavored bottled water." Applied and Environmental Microbiology **68**(8): 4130-4131.
- Moreno, S., T. Scheyer, *et al.* (2006). "Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition." Free Radical Research **40**(2): 223-231.
- Morot-Gaudry, J. F., R. Prat, *et al.* (2012). Biologie végétale : Croissance et développement - 2e édition, Dunod.
- Mulet, M., J. Lalucat, *et al.* (2010). "DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species." Environmental Microbiology **12**(6): 1513-1530.
- Nagoba, B. S., S. R. Deshmukh, *et al.* (1998). "Treatment of superficial pseudomonal infections with citric acid: an effective and economical approach." Journal of Hospital Infection **40**(2): 155-157.
- Nagoba, B. S., R. C. Gandhi, *et al.* (1998). "Citric acid treatment of severe electric burns complicated by multiple antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*." Burns **24**(5): 481-483.
- Nakoryakov, V. E., S. Y. Misyura, *et al.* (2012). "The behavior of water droplets on the heated surface." International Journal of Heat and Mass Transfer **55**(23-24): 6609-6617.
- Nazzaro, F., F. Fratianni, *et al.* (2013). "Effect of essential oils on pathogenic bacteria." Pharmaceuticals **6**(12): 1451-1474.
- Nevarez, L., V. Vasseur, *et al.* (2009). "Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water." International Journal of Food Microbiology **130**(3): 166-171.
- Neyret, C., J. M. Herry, *et al.* (2014). "Plant-derived compounds as natural antimicrobials to control paper mill biofilms." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **41**(1): 87-96.
- Nguyen, T., B. Clare, *et al.* (2005). "The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*." European Biophysics Journal **34**(5): 389-395.
- Nichols, N. N. and J. A. Mertens (2008). "Identification and transcriptional profiling of *Pseudomonas putida* genes involved in furoic acid metabolism." Fems Microbiology Letters **284**(1): 52-57.
- Nikel, P. I., J. Kim, *et al.* (2014). "Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440." Environmental Microbiology **16**(1): 239-254.
- Nsanze, H., Z. Babarinde, *et al.* (1999). "Microbiological quality of bottled drinking water in the UAE and the effect of storage at different temperatures." Environment International **25**(1): 53-57.
- O'Gara, E. A., D. J. Hill, *et al.* (2000). "Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*." Applied and Environmental Microbiology **66**(5): 2269-2273.
- Oh, D.-H. and D. L. Marshall (1993). "Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*." International Journal of Food Microbiology **20**(4): 239-246.
- Ou, S. Y. and K. C. Kwok (2004). "Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods." Journal of the Science of Food and Agriculture **84**(11): 1261-1269.
- Palleroni, N. J. (2005^a). Genus I. *Pseudomonas*. Bergey's manual of systematic bacteriology - second edition - vol. 2 - The Proteobacteria - Part B The Gammaproteobacteria. G. M. Garrity. East Lansing, Michigan, USA, Springer.
- Palleroni, N. J. (2005^b). Genus I. *Burkholderia*. Bergey's manual of systematic bacteriology - second edition - vol. 2 - The Proteobacteria - Part C The Alpha-, Beta-, Delta, and Epsilonproteobacteria. G. M. Garrity. East Lansing, Michigan, USA, Springer.

- Park, S. H., M. R. Choi, *et al.* (2011). "Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce." Journal of Food Science **76**(6): M293-M298.
- Park, Y.-D., H. B. Lee, *et al.* (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.
- Pellerin, P. (2012). Les hydrolats. <https://patrickpellerin.wordpress.com/>.
- Perrière, G. and M. Gouy (1996). "WWW-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks." Biochimie **78**(5): 364-369.
- Pimentel, M. R., G. Molina, *et al.* (2012). "Biotransformation of citronellol in rose oxide by *Pseudomonas spp.*" Ibic2012: International Conference on Industrial Biotechnology **27**: 295-300.
- Poole, K. (2014). "Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more." Canadian Journal of Microbiology **60**(12): 783-791.
- Poudrier, J. K. (1990). "Final report on the safety assessment of phenoxyethanol." Journal of the American College of Toxicology **9**(2): 259-277.
- Prabudharwadkar, D. M., R. Z. More, *et al.* (2010). "Experimental study of liquid carryover in a separator drum." Nuclear Engineering and Design **240**(1): 76-83.
- Ramadan, F. M. and H. A. Abd-Elnaby (1962). "Bacteriological examination of unbottled soft drinks." Applied Microbiology **10**: 311-320.
- Ramalho, R., A. Afonso, *et al.* (2001). "Survival characteristics of pathogens inoculated into bottled mineral water." Food Control **12**(5): 311-316.
- Raybaudi-Massilia, R. M., J. Mosqueda-Melgar, *et al.* (2009). "Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices." Food Control **20**(2): 105-112.
- Reasoner, D. J. (2004). "Heterotrophic plate count methodology in the United States." International Journal of Food Microbiology **92**(3): 307-315.
- Rees, J., T. Loyn, *et al.* (2007). "The erosive potential of some flavoured waters." European Journal of Dentistry **1**(1): 5-9.
- Renganathan, V. and K. M. Madyastha (1983). "Linalyl acetate is metabolized by *Pseudomonas incognita* with the acetoxy group intact." Applied and Environmental Microbiology **45**(1): 6-15.
- Richardson, S. D., M. J. Plewa, *et al.* (2007). "Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research." Mutation Research/Reviews in Mutation Research **636**(1-3): 178-242.
- Rizner Hras, A., M. Hadolin, *et al.* (2000). "Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with alpha-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil." Food Chemistry **71**(2): 229-233.
- Roberts, T. A., J. L. Cordier, *et al.* (2005). Soft drinks, fruit juices, concentrates, and fruit preserves. Micro-Organisms in Foods **6**. T. A. Roberts, J. L. Cordier, L. Gramet *al*, Springer US: 544-573.
- Rondon, M. R., P. R. August, *et al.* (2000). "Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms." Applied and Environmental Microbiology **66**(6): 2541-2547.
- Roper, C. S., D. Howes, *et al.* (1997). "Percutaneous penetration of 2-phenoxyethanol through rat and human skin." Food and Chemical Toxicology **35**(10-11): 1009-1016.
- Rosenberg, F. A. (2003). "The microbiology of bottled water." Clinical Microbiology Newsletter **25**(6): 41-44.

- Rushton, L., A. Sass, *et al.* (2013). "Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of *Burkholderia cepacia* complex bacteria." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**(7): 2972-2980.
- Sagdic, O. and M. Ozcan (2003). "Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols." Food Control **14**(3): 141-143.
- Sagdic, O., I. Ozturk, *et al.* (2013). "Inactivation of non-toxigenic and toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on minimally processed tomatoes and cucumbers: Utilization of hydrosols of Lamiaceae spices as natural food sanitizers." Food Control **30**(1): 7-14.
- Salazar, H. C., H. Moura, *et al.* (1982). "Isolation of free-living Amebas from bottled mineral water." Revista De Saude Publica **16**(5): 261-267.
- Schnuch, A., G. Mildau, *et al.* (2011). "Risk of sensitization to preservatives estimated on the basis of patch test data and exposure, according to a sample of 3541 leave-on products." Contact Dermatitis **65**(3): 167-174.
- Schroeder, C. D. (1990). Solutions to boiler and cooling water problems. New-York, USA, Springer.
- Scognamiglio, J., L. Jones, *et al.* (2012). "Fragrance material review on 2-phenoxyethanol." Food and Chemical Toxicology **50**, Supplement **2**(0): S244-S255.
- Sedlackova, P., M. Cerovsky, *et al.* (2011). "Cell surface characteristic of *Asaia bogorensis* - spoilage microorganism of bottled water." Czech Journal of Food Sciences **29**(4): 457-461.
- Shepherd, J. A., R. D. Waigh, *et al.* (1988). "Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol)." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **32**(11): 1693-1698.
- Shimizu, J., M. Uehara, *et al.* (1982). "Transformation of terpenoids in grape must by *Botrytis cinerea*." Agricultural and Biological Chemistry **46**(5): 1339-1344.
- Silveira, M. G., M. Baumgärtner, *et al.* (2004). "Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*." Applied and Environmental Microbiology **70**(5): 2748-2755.
- Sirk, T. W., E. F. Brown, *et al.* (2008). "Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(17): 7750-7758.
- Smith-Palmer, A., J. Stewart, *et al.* (1998). "Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens." Letters in Applied Microbiology **26**(2): 118-122.
- Smith, H. L., Jr. and K. Goodner (1958). "Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods." Journal of Bacteriology **76**(6): 662-665.
- Stanojevic, D., L. Comic, *et al.* (2009). "Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro." Bulgarian Journal of Agricultural Science **15**(4): 308-312.
- Stopnisek, N., N. Bodenhausen, *et al.* (2014). "Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations." Environmental Microbiology **16**(6): 1503-1512.
- Stratford, M., P. D. Hofman, *et al.* (2000). Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks The microbiological safety and quality of food. B. M. Lund, T. A. C. Baird-Parker and G. W. Gould. Gaithersburg, Maryland, U.S, Aspen Publishers, Inc. **Vol. 1**.
- Suhara, K., S. Takemori, *et al.* (1969). "The purification and properties of benzylalcohol dehydrogenase from *Pseudomonas* SP." Archives of Biochemistry and Biophysics **130**(0): 422-429.
- Sun, S.-W., Y.-C. Lin, *et al.* (2006). "Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification." Journal of Food Composition and Analysis **19**(2-3): 112-117.

- Tai, J., S. Cheung, *et al.* (2012). "Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro." Phytomedicine **19**(5): 436-443.
- Takeuchi, M., K. Hamana, *et al.* (2001). "Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(4): 1405-1417.
- Tayeb, L. A., M. Lefevre, *et al.* (2008). "Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences." Research in Microbiology **159**(3): 169-177.
- Tiwari, B. K., V. P. Valdramidis, *et al.* (2009). "Application of natural antimicrobials for food preservation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(14): 5987-6000.
- Tornuk, F., H. Cankurt, *et al.* (2011). "Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on fresh cut carrots and apples." International Journal of Food Microbiology **148**(1): 30-35.
- Tsai, G.-J. and S.-C. Yu (1997). "Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan." International Journal of Food Microbiology **37**(2-3): 137-143.
- Tsantilas, H., A. D. Galatos, *et al.* (2006). "Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C." Aquaculture **253**(1-4): 64-70.
- Ulusoy, S., G. Bosgelmez-Tinaz, *et al.* (2009). "Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute." Current Microbiology **59**(5): 554-558.
- Van Overbeek, L. S., L. Eberl, *et al.* (1995). "Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved pseudomonas-fluorescens cells residing in soil." Applied and Environmental Microbiology **61**(12): 4202-4208.
- van Schie, C. C. N., M. A. Haring, *et al.* (2006). "Regulation of terpenoid and benzenoid production in flowers." Current Opinion in Plant Biology **9**(2): 203-208.
- Vandenbergh, P. A. (1989). "Bacterial method and compositions for linalool degradation." U.S patent No 4,800,158 issued Jan. 24, 1989.
- Vandenbergh, P. A. and R. L. Cole (1986). "Plasmid involvement in linalool metabolism by *Pseudomonas fluorescens*." Applied and Environmental Microbiology **52**(4): 939-940.
- Vandenbergh, P. A. and A. M. Wright (1983). "Plasmid involvement in acyclic isoprenoid metabolism by *Pseudomonas putida*." Applied and Environmental Microbiology **45**(6): 1953-1955.
- Vanlaere, E., A. Baldwin, *et al.* (2009). "Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **59**(1): 102-111.
- Varga, L. (2011). "Bacteriological quality of bottled natural mineral waters commercialized in Hungary." Food Control **22**(3-4): 591-595.
- Vijayalakshmi, G., N. S. Hettiarachchy, *et al.* (2012). "Electrostatic spraying of food-grade organic and inorganic acids and plant extracts to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and iceberg lettuce." Journal of Food Science **77**(7): M391-M396.
- Volokhov, D. V., V. Simonyan, *et al.* (2012). "RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family *Mycoplasmataceae*." Molecular Phylogenetics and Evolution **62**(1): 515-528.

- Voon, H. C., R. Bhat, *et al.* (2012). "Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **11**(1): 34-55.
- Wagner, C., M. Sefkow, *et al.* (2003). "Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles." Phytochemistry **62**(6): 887-900.
- Warburton, D. W. and J. W. Austin (2000). Bottled water. The microbiological safety and quality of food. B. M. Lund, T. A. C. Baird-Parker and G. W. Gould. Gaithersburg, Maryland, U.S., Aspen Publishers, Inc. **Vol. 1**.
- Watt, M. (2015) "Hydrosols - production & Sales Hype."
- Whitaker, J. R. and C. Y. Lee (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning - an overview. Enzymatic Browning and Its Prevention. C. Y. Lee and J. R. Whitaker. **600**: 2-7.
- Wilkinson, J. M., M. Hipwell, *et al.* (2003). "Bioactivity of backhousia citriodora: Antibacterial and antifungal activity." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(1): 76-81.
- Williams, T. M. (2007). "The mechanism of action of isothiazolone biocides." PowerPlant Chemistry **9**(1): 14 - 22.
- Wolken, W. A. M. and M. J. van der Werf (2001). "Geraniol biotransformation-pathway in spores of *Penicillium digitatum*." Applied Microbiology and Biotechnology **57**(5-6): 731-737.
- Würbach, G., H. Schubert, *et al.* (1993). "Contact allergy to benzyl alcohol and benzyl paraben." Contact Dermatitis **28**(3): 187-188.
- Xu, W., W. Qu, *et al.* (2007). "Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables." Postharvest Biology and Technology **45**(1): 126-133.
- Yanagawa, Y., Y. Yamamoto, *et al.* (2003). "A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro." Current Microbiology **47**(3): 244-249.
- Yılmaz, S., F. Ünal, *et al.* (2009). "The in vitro genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes." Cytotechnology **60**(1-3): 55-61.
- Zhu, Y.-J., H.-T. Zhou, *et al.* (2011). "Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid." Food Chemistry **124**(1): 298-302.

10. Valorisations du travail de thèse

Cette thèse a donné lieu à des communications écrites et orales :

Article scientifique publié dans la revue « Food Research International » - Elsevier :

Labadie, C., et al., **“Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota”**, Food Research International (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.014>

Communiqué de presse :

“La conservation : un enjeu majeur pour les produits aromatiques 100 % naturels » Diffusé le 18 Aout 2015 sur le site inra.fr : <http://presse.inra.fr/Ressources/Communiqués-de-presse/produits-aromatiques>

Communications orales:

En congrès international:

“Hydrosols of *Citrus aurantium* and *Rosa* sp. support the growth of a diverse spoilage microflora impacting volatile compounds” Cécile Labadie, Christian Ginies, Marie-Hélène Guinebretiere, Catherine Renard, Céline Cerutti¹, Frédéric Carlin. *Iseo 2015 – 46th International symposium on essential oils*. September 13-16 2015 – Lublin, Poland.

En France:

- Journée d’animation du pôle Production Horticole Intégrée :

« Microflore des hydrolats: impact sur les composés aromatiques » Cécile Labadie. *5ième journée d'animation sur les métabolites secondaires - Groupe Métabolites Secondaires*. 04 décembre 2014 – Avignon, France

- Journées des doctorants :

« Analyse fine et stabilisation des eaux florales » Cécile Labadie. *Journées annuelles des doctorants de l’INRA* – Décembre 2012, 2013 et 2014 - Avignon, France

- Animation scientifique – présentation à équipe :

« Analyse fine et stabilisation des eaux florales » Cécile Labadie. *Animation scientifique* – 09 Juin 2014 - Avignon, France

Communication visuelle :

Poster en congrès international:

“Characterisation of spoilage microflora in Rose flower and Orange Blossom hydrosols” Cécile Labadie, Céline Cerutti, Christian Giniès, Catherine Renard, Frédéric Carlin. *FOOD MICRO 2014 - 24th International ICFMH conference*. September 1-4 2014 – Nantes, France

10.1. Poster

présenté lors du congrès international « Food Micro 2014 » (Nantes, France)

Characterisation of spoilage microflora in Rose flower and Orange Blossom hydrosols

Cécile Labadie^{1,2}, Céline Cerutti¹, Christian Giniès^{2,3}, Catherine Renard², Frédéric Carlin²

¹ Albert Vieille SAS, 06227 Vallauris, France.

² INRA, Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon. France

³ INRA, UMR1260, Marseille, France.

Rose flower and Orange Blossom hydrosols are steam distillation products mainly used as food flavoring agents or ingredients of cosmetic products. These are subjected to microbial proliferation that can alter organoleptic properties and prevent cosmetic use due to non-compliance to professional microbiological standards. The aim of this study was to ascertain whether there were specific microorganisms in Rose water and Orange Blossom water, their growth parameters, and their impact on the aromatic compounds. Then, we determined the ability of some selected spoilage and pathogenic bacteria to grow in hydrosols.

Rose flower and Orange Blossom hydrosol samples from the Mediterranean Basin studied in this work contained a maximal amount of 0.06 % of essential oil giving the flavoring properties and quality; this concentration was not high enough to inhibit bacterial growth. These hydrosols also contained floral compounds carried over by foaming and priming during the distillation process. These non volatile compounds (sugars, fatty acids, and carboxylic acids), can be used as nutrients by microorganisms. Microbiological concentrations are generally comprised between 10^5 and 10^7 total counts cfu/mL and bacteria were the only micro-organisms detected in both products. Approximately 40 strains were isolated in both hydrosols from different locations. 16S rRNA gene sequencing identified the major species as *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, and two undefined species belonging to *Acetobacteraceae* and *Rhodospirillaceae*. Changes in populations were observed over 3 and 6 months storage period at ambient temperature and at 5°C. Changes in aromatic profiles during storage were also followed. Growth capacities of pathogenic species and spoilage bacteria had been followed in hydrosols. These results provide a better understanding of hydrosols microflora and may open the door for new ways to improve quality of Rose flower and Orange blossom hydrosols.

Characterisation of Spoilage Microflora in Rose Flower and Orange Blossom Hydrosols



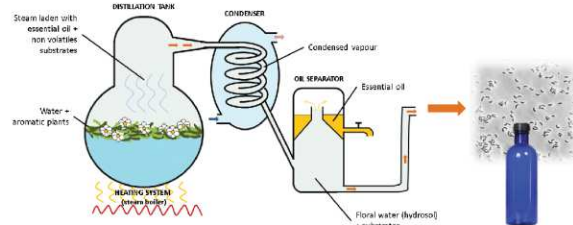
Cécile Labadie^{1,2}, Céline Cerutti¹, Christian Giniès^{2,3}, Catherine M.G.C. Renard², Frédéric Carlin²

¹ Albert Vieille SAS, F-06227 Vallauris, France
² INRA, Avignon Université, UMR408 Sécurité et qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France
³ INRA, AMU, UMR1260 NORT, F-13385 Marseille, France

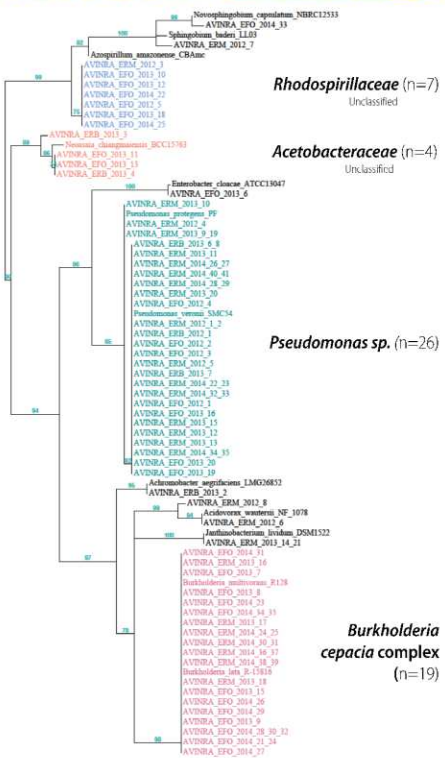


INTRODUCTION

Rose flower and orange blossom hydrosols are steam distillation products mainly used as food flavoring agents or ingredients of cosmetics. Even though some hydrosols can be used as antimicrobials [1], both studied hydrosols are subject to microbial growth that can alter organoleptic properties and prevent cosmetic use due to non-compliance to professional microbiological standards [2]. Our aim was to characterize the microflora of rose and orange blossom hydrosols, its behavior, and its capacity to metabolize the aromatic compounds. Then, the ability of some selected spoilage and pathogenic microorganisms to grow in those hydrosols was tested.



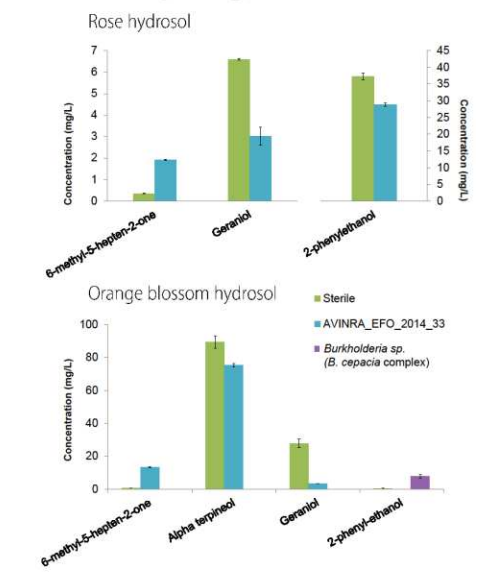
RESULTS



Spoilage bacteria

We analyzed 14 orange blossom and 11 rose hydrosols from different locations around the Mediterranean basin. The bacterial concentrations were higher than $2 \log_{10}$ CFU/mL in all of them, more than the specifications of the French pharmacopeia. Most of identified species are known as Gram-negative environmental contaminants (Fig. 1) and belong to a limited number of genera. Strains are arranged in four major branches. None of them is hydrosol-, or year of production-, or origin-dependent.

Hydrosols aromatic compounds are impacted by spoilage bacteria



Results of challenge tests in hydrosols

Strain	Changes in microbial counts after 100 h incubation at 30°C (log ₁₀ CFU/mL)	
	Orange blossom	Rose
<i>P. protegens</i> (n=11, 20, 25, 31, 32)	+ 2.2 (± 0.1)	+ 2.4 (± 0.1)
<i>Burkholderia sp.</i> (AVINRA_EFO_2014_33)	+ 2.9 (± 0.1)	+ 2.9 (± 0.1)
<i>E. coli</i> (CP 3412)	- 2.5 (+ 0.50)	+ 0.4 (+ 0.16)
<i>S. aureus</i> (SF 448)	< - 3.5 (± 0.03)	< - 3.5 (± 0.03)
<i>P. aeruginosa</i> (CF 15246)	< - 3.5 (± 0.02)	< - 2.8 (± 0.10)
<i>P. syringae</i> (C2154)	< - 2.3 (± 0.08)	< - 2.3 (± 0.1)
<i>B. cereus</i> (HTCC 4579)	< - 3.6 (± 0.01)	< - 2.4 (± 0.20)
<i>C. albicans</i> (HTCC 1051)	< - 4.5 (± 0.10)	< - 4.5 (± 0.10)
<i>A. niger</i> (HTCC 1042)	No growth observed	

Tableau 1 Challenge test on commercial orange blossom and rose hydrosols

Burkholderia sp. and *P. protegens* have been isolated from hydrosols and seemed to be adapted to growth in such a poor in nutrients matrix, in contrast with spoilage microorganisms and pathogenic strains.

Figure 2 Impact of spoilage bacteria on aromatic compounds of orange blossom and rose hydrosols

Orange blossom hydrosol contains between 350 mg/L and 700 mg/L of essential oil. Rose hydrosol contains 150 mg/L of essential oil. Fig. 2, aromatic profiles changed with bacteria contamination which notably affected 2-phenylethanol, geraniol and 6-methyl-5-hepten-2-one [3;4;5]. A sensory expert panel judged the product flavor unacceptable for any use.

CONCLUSION

- The concentration of essential oil in hydrosols is not sufficient to guarantee microbiological stability.
- The major species found in both hydrosols were environmental contaminants such as *Burkholderia sp.*, *Pseudomonas sp.*, and two undefined bacteria belonging to *Rhodospirillaceae* and *Acetobacteraceae*.
- These strains were able to grow in hydrosols in contrast with several human pathogens and other spoilage microorganisms.
- The natural microflora in hydrosols showed the ability to metabolize aromatic compounds.

1. Kowalski, J., et al. (2011). Phylogeny of a new plant pathogen from the order Rhodospirillales, the genus Rhodospirillum, and its relationship to other members of the order Rhodospirillales. *Journal of Microbiology* 149(3): 503-515.

10.2. Communiqué de presse

diffusé sur le site inra.fr et est accessible à l'adresse:

<http://presse.inra.fr/Ressources/Communiqués-de-presse/produits-aromatiques>

La conservation : un enjeu majeur pour les produits aromatiques 100 % naturels

La conservation des eaux florales est aujourd'hui réalisée avec des conservateurs de synthèse altérant la naturalité des eaux florales et ses bienfaits. Il n'existe pas à ce jour de conservation naturelle efficace des eaux florales. C'est dans cette optique que l'Inra avec la collaboration de la société Albert Vieille (spécialisée dans la production de matières premières aromatiques 100% pures et naturelles) effectue des travaux de recherche sur la conservation naturelle des eaux florales. Pour proposer de nouvelles techniques de conservation et identifier des conservateurs naturels, les chercheurs ont scruté le comportement de la microflore de plusieurs eaux florales selon différentes compositions ou conditions de stockage, et son impact sur la saveur et les arômes. Leurs premiers résultats sont publiés dans la revue *Food Research International*, le 12 août 2015.

Mis à jour le 19/08/2015

Publié le 18/08/2015

Mots-clés : CONSERVATION - arôme - eaux florales

La mise en place de techniques de conservation naturelles des eaux florales[1] nécessite une parfaite connaissance de leur composition microbiologique. Au sein de l'unité Sécurité et qualité des produits d'origine végétale (Inra, Université d'Avignon), les chercheurs ont caractérisé la microflore de plusieurs eaux florales : rose de mai (*Rosa centifolia*), rose de Bulgarie (*Rosa damascena* Miller) et fleur d'oranger - bigaradier (*Citrus aurantium*L.ssp. *amara*L.). Ils ont observé le comportement de cette microflore selon différentes compositions et conditions de stockage ainsi que son impact sur les composés volatils responsables des propriétés organoleptiques (saveur et arôme).

Les analyses ont révélé que les eaux florales (ou hydrolats) contiennent les mêmes composés antimicrobiens que les huiles essentielles[2] extraites de ces plantes mais en nettement plus faible quantité (généralement moins d'un gramme par litre d'huile essentielle), ce qui est insuffisant pour maintenir leur stabilité sans ajout de conservateur. De plus, ces analyses ont révélé que ces hydrolats sont composés d'éléments hydrosolubles encore mal connus.

Les chercheurs ont observé des populations de bactéries relativement diverses, non spécifiques d'un type d'eau florale (issues de quatre branches phylogénétiques distinctes : *Pseudomonas* sp, *Burkholderia cepacia*, *Rhodospirillaceae*, *Acetobacteraceae*). Il apparaît que certaines de ces bactéries peuvent affecter les propriétés aromatiques des eaux florales, en induisant des modifications chimiques dans les profils des composés volatils.

Les résultats montrent également qu'une conservation en chambre froide n'est pas suffisante pour assurer la stabilité de ces hydrolats. En effet, la population bactérienne augmente, parfois en quelques jours seulement, que les eaux florales soient stockées à température ambiante ou à 5°C. Un des processus pouvant favoriser la prolifération des bactéries dans les eaux florales est le primage, ou effet moussant, que l'on peut observer lors de la distillation et qui est dû à la forte température de chauffe. Cet effet a comme particularité d'introduire dans le distillat des composés non-volatils utilisés comme nutriments par les bactéries et favorisant ainsi leur développement. De plus, le processus de préparation des eaux florales, généralement réalisé en plein air, est présenté dans ces travaux comme un stade important de la contamination bactérienne. Un stockage en emballage stérile immédiatement à la fin de la distillation devrait pouvoir assurer, par exemple, la stabilité des eaux florales. En effet, lorsque les eaux florales pures sont stockées dans des containers non stériles, à température ambiante ou à 5°C, les chercheurs ont observé une prolifération microbienne non négligeable. Les populations bactériennes dans les hydrolats étudiés peuvent ainsi atteindre jusqu'à 107 unités formant colonies (UFC) par millilitres, soit nettement plus que la valeur recommandée par les autorités sanitaires pour un produit commercialisable, qui est de 102 UFC/mL.

La prochaine étape pour les chercheurs de l'Inra et le service de R&D de l'entreprise Albert Vieille SAS : identifier des conservateurs d'origine naturelle propres à garantir, dans un environnement de production et de stockage maîtrisé, la stabilité des eaux florales.

[1] Les eaux florales (ou hydrolats) sont obtenues par entraînement à la vapeur d'eau de diverses parties de plantes, aromatiques ou non.

[2] Les huiles essentielles constituent la phase huileuse, très concentrée en composés aromatiques notamment, présente à la surface de phase aqueuse (hydrolat) à l'issue d'une distillation de végétaux. Elles sont connues pour leurs effets anti-microbiens.

Contact(s) scientifique(s) :

Frédéric Carlin (04 32 72 25 19) Sécurité et qualité des produits d'origine végétale

Céline Cerutti-Delasalle / responsable Projet R&D chez Albert Vieille SAS (04 93 64 72 96)

Contact(s) presse :

Inra service de presse (01 42 75 91 86)

Département(s) associé(s) :

Microbiologie et chaîne alimentaire, Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture

Centre(s) associé(s) :

Provence-Alpes-Côte d'Azur

Référence

Labadie, C., *et al.*, Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota, Food Research International (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.014>

10.3. Communication orale

Présentée lors du congrès international « Iseo 2015 » 14-16 Septembre 2015, Lublin, Pologne. L'abstract est le suivant :

Hydrosols of *Citrus aurantium* and *Rosa sp.* support the growth of a diverse spoilage microflora impacting volatile compounds

Cécile Labadie^{1,2*}, Christian Ginies², Marie-Hélène Guinebretiere², Catherine Renard², Céline Cerutti¹, Frédéric Carlin^{2*}

¹ Albert Vieille SAS, 06227 Vallauris, France

² INRA, Avignon Université, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

*Corresponding authors. E-mail: ce.labadie@hotmail.com; frederic.carlin@avignon.inra.fr

Citrus aurantium L. ssp. *amara* L., *Rosa centifolia* L. and *Rosa damascena* Miller hydrosols (also called hydrolats) are hydrodistillation products mainly used as food flavoring agents or ingredient in cosmetics. We analyzed 22 hydrosol samples collected from different manufacturers around the Mediterranean basin and in Eastern Europe, at storage time between 0 (sampling at processing day) and 13 months. These hydrosols contained essential oil (EO), at median concentrations ranging between 116 mg/L in the *Rosa centifolia* hydrosols mainly composed of 2-phenylethanol and citronellol, and 677 mg/L in the *Citrus aurantium* hydrosols mainly composed of linalool and alpha-terpineol. Although essential oils have been described for antimicrobial effects, with reported MIC of essential oil compounds ranging between 200 to 1000 mg/L against, there were not in sufficient concentrations to prevent microbial proliferation of hydrosol bacteria, the only microorganisms detected in the tested hydrosols. Maximal bacterial counts in hydrosols sampled a few days to a few months storage after processing (using a Malassez counting chamber and decimal dilutions on solid medium in Petri dishes) were in the range 10^6 - 10^7 CFU/mL and did not comply with professional standards which recommends bacterial counts lower than 10^2 CFU/mL. Only hydrosols stored in a sterile packaging showed the lowest count during a three months period (<5 CFU/mL). This suggests that contaminations likely occur during operations handling hydrosols in the open air, i.e. in non-sterile conditions. The 58 hydrosol bacterial isolates were divided into 4 major branches: a *Pseudomonas sp.* branch, a *Burkholderia cepacia* complex branch, and two undefined species branches belonging to *Acetobacteraceae* and *Rhodospirillaceae*. These bacteria require low nutrients for growth and are environmental contaminants. A few of them could metabolize alpha-terpineol and

geraniol, with a concomitant production of 6-methyl-5-hepten-2-one, and could also metabolize 2-phenylethyl acetate with a concomitant production of 2-phenylethanol. Challenge tests with pathogenic or reference micro-organisms (*Bacillus cereus*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella enterica enterica* Typhimurium, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*) showed that only *P. aeruginosa*, and *A. brasiliensis* were able to multiply at 30°C in at least one of the tested hydrosol. None of these microorganisms has been found among hydrosol isolates. In conclusion packaging in aseptic conditions could contribute to the microbiological stability of hydrosols during long-term storage. If not, a chemical stabilization with preservatives should be considered.

Keywords: Hydrosol, orange blossom water, rose water, essential oil, challenge-tests, pathogenic bacteria, spoilage bacteria.

Hydrosols are hydrodistillation products mainly used as food flavoring agents or ingredient in cosmetics. They contain less than 1 g/L of dispersed essential oils giving the organoleptic properties. These are subjected to microbial proliferation that can prevent use due to non-compliance to professional microbiological standards. The microorganisms, their growth dynamics, and the available nutrients in hydrosols remain unknown. Hydrosols can contain few preservatives, but there is no data about their efficiency in hydrosols.

The aim of this study was to have a better knowledge on hydrosols composition, their microbiota, and spoilage conditions, in order to propose an adapted stabilization method.

The composition in volatile compounds and the microbiota of 22 hydrosol samples of *Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L. (orange blossom), *Rosa damascena* Miller (rose D.), and *Rosa centifolia* L. (rose C.) flowers were analyzed to determine factors responsible for decay. Some non-volatile compounds were likely carried over during distillation by a priming and foaming effect, and could be used as nutrients by microorganisms. Concentrations of volatile compounds in hydrosols are not high enough to prevent microbial proliferation, and bacteria concentrations can reach up to 6 log₁₀ CFU/mL in both hydrosols. The isolated microbial population was composed of oligotrophic Gram-negative bacteria, arranged in four major genera: *Pseudomonas* sp., *Burkholderia cepacia* complex, and presumably two new genera belonging to *Acetobacteraceae* and *Rhodospirillaceae*. Among those bacteria, *Burkholderia vietnamiensis* and *Novosphingobium capsulatum* were able to metabolize volatile compounds, such as geraniol to produce 6-methyl-5-hepten-2-one or geranic acid, or 2-phenylethyl acetate to produce 2-phenylethanol. Finally, the growth potential of a range of bacteria isolated from hydrosols and of pathogenic micro-organisms was evaluated, then the anti-microbial activity in nutrient broth and/or in hydrosols of a range of chemical preservatives authorized for food and cosmetic applications was tested.

Additional hurdles such as chemical preservatives or aseptic packaging will be necessary to insure microbial stability.

Les eaux florales sont des matières premières aromatiques issues de la distillation, contenant généralement moins de 1 g/L de composés volatils leur conférant leurs propriétés organoleptiques. Elles sont utilisées principalement en industrie agroalimentaire et cosmétique. Elles sont sujettes à des problèmes d'instabilité microbienne incompatibles avec leurs applications. Ces microorganismes, leurs dynamiques, ainsi que les nutriments disponibles nécessaires à leur croissance restent mal connus. Les eaux florales sont actuellement stabilisées par ajout de conservateurs dont certains sont controversés et visent à être retirés du marché. De plus, leur efficacité dans les eaux florales n'a pas été évaluée.

L'objectif de cette thèse est d'apporter une meilleure connaissance de la composition des eaux florales et de ses contaminants afin de proposer une méthode de stabilisation adaptée.

La composition en huile essentielle et le microbiote de 22 échantillons d'eau de fleur d'oranger (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara* L.) et de rose (*Rosa damascena* Miller et *Rosa centifolia* L.), provenant de différents producteurs autour du bassin méditerranéen, ont été analysés afin de déterminer les facteurs responsables de leur altération. Bien que les composés volatils soient connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, leurs concentrations dans les hydrolats ne sont pas suffisantes pour assurer la stabilité microbiologique. En plus des composés volatils, les hydrolats contiennent des composés non-volatils tels que des sucres, entraînés vers le distillat par effet de primage ou de moussage pendant la distillation, et pouvant être utilisés comme substrat de croissance par les microorganismes. La population microbienne peut atteindre 6 à 7 log₁₀ UFC/mL en quelques jours à température ambiante et jusqu'à 3 mois à 5°C. Des bactéries environnementales, oligotrophes, et acido-tolérantes, appartenant principalement aux genres *Pseudomonas* sp. et *Burkholderia* sp. ont été isolées et identifiées. Parmi ces bactéries, *B. vietnamiensis* et *Novosphingobium capsulatum* ont été capables de métaboliser des composés volatils tels que le géraniol ou l'acétate de 2-phényléthyle pour produire la 6-méthyl-5-heptèn-2-one ou le 2-phényléthanol, et modifier ainsi les propriétés organoleptiques des hydrolats. Enfin, la capacité de croissance de bactéries pathogènes et d'altération dans les hydrolats a été évaluée, et différents conservateurs ont été testés sur les souches capables de se multiplier dans les hydrolats.

Une distillation aseptique et un conditionnement stérile permettrait d'assurer la stabilité des hydrolats sans ajout de conservateurs. En l'absence de conditions aseptiques, l'ajout de conservateurs est nécessaire pour assurer la stabilité des hydrolats.