

66

ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DE L'EAU PAR MESURE POTENTIOMÉTRIQUE DE LA RÉDUCTION DE L'ACIDE LIPOÏQUE

G. CHARRIÈRE*, T. JOUENNE*, G.A. JUNTER**

* Laboratoire Municipal d'Hygiène, 5, rue Raymond-Guénot - 76600 LE HAVRE (FRANCE)

** Laboratoire de Chimie Macromoléculaire, E.R.A. 471, Faculté des sciences de Rouen, 76130 MONT-SAINT-AIGNAN (FRANCE)

RÉSUMÉ - La présente communication décrit l'application d'une technique potentiométrique simple à la détection et au dénombrement des bio-indicateurs de contamination dans l'eau.

Cette technique consiste à mesurer le potentiel rédox d'un milieu de culture spécifique saturé en oxygène où des bactéries sont mises à incuber en présence d'acide lipoiïque (AL). Les micro-organismes réduisent AL en acide dihydrolipoiïque, dont l'apparition dans le milieu de culture engendre une chute importante du potentiel. Ce "signal" potentiométrique révèle la présence de bactéries métaboliquement actives dans le milieu. En outre, lorsque les conditions de culture sont étroitement standardisées (température, agitation, pH, composition du milieu), le délai qui s'écoule entre l'inoculation et l'apparition du signal ("temps de latence") est une fonction linéaire décroissante du nombre de cellules viables inoculées ; la pente de la droite dépend de l'espèce microbienne étudiée.

Le signal potentiométrique n'est pas sélectif en lui-même, puisque de nombreuses espèces bactériennes, notamment la majorité de celles qui appartiennent à la flore naturelle de l'eau, sont capables de réduire AL. Appliquer la technique potentiométrique à l'analyse bactériologique de l'eau nécessitait donc d'imposer des conditions de culture sélectives des seuls bio-indicateurs de contamination sans pour autant perturber les phénomènes rédox. Nous référant aux procédés classiques d'isolement des coliformes fécaux (milieu lactosé contenant du désoxycholate de sodium, température d'incubation élevée), nous sommes parvenus à détecter et dénombrer sélectivement *Escherichia coli* parmi la flore bactérienne d'échantillons d'eau issus du milieu naturel (eaux moyennement ou fortement contaminées : eaux de surface ou eaux résiduaires). Dans une faible proportion des échantillons analysés (environ 6 %), *E. coli* était associé à *Klebsiella pneumoniae*. L'analyse statistique des temps de latence potentiométriques en fonction du nombre de cellules de *E. coli* présentes dans les échantillons a conduit à une droite de régression dont le coefficient de corrélation (0.95) est satisfaisant. En extrapolant cette droite de régression aux très faibles concentrations microbiennes, on peut estimer que 1 *E. coli* dans 100 ml d'eau serait détecté en moins de 15 heures.

Ainsi, il semble possible d'appliquer la technique potentiométrique à la détection sélective de *E. coli* dans les eaux, même faiblement contaminées (eaux potables, par exemple), avec une sensibilité comparable à celle que revendiquent d'autres techniques récemment développées (mesure d'impédance, radiométrie, etc.). Les atouts majeurs des mesures potentiométriques en présence de AL résident dans la fiabilité et l'intelligibilité des résultats (les phénomènes rédox ont été étudiés qualitativement et quantitativement), alliées à une grande simplicité technologique. En outre, cette technique est parfaitement adaptable à d'autres milieux que les eaux douces, tels que eaux marines, ou encore liquides biologiques (sang, urine), alimentaires (lait).

ABSTRACT - The present communication describes the utilization of a simple potentiometric technique to detect and enumerate the bio-indicators of water contamination.

The technique consists in measuring the redox potential of a specific culture medium saturated with oxygen where bacteria are incubated in presence of lipoïd acid (LA). These micro-organisms reduce LA to dihydrolipoïc acid, giving rise to an important potential drop in the system. This potentiometric "signal" reveals the presence of active metabolic bacteria in the medium. Moreover, when the culture conditions are strictly standardised

(temperature, agitation, pH, medium composition), the time elapsed between the inoculation and the signal appearance (latent time) is a negative linear function of the number of viable inoculated cells: the slope of the line depends on the microbial species studied.

In itself the potentiometric signal is not selective, since numerous bacterial species, notably the majority of those associated to the natural water flora are capable of reducing LA. In order to apply the potentiometric technique to the bacteriological water analysis, it is thus necessary to impose, only to the bio-indicators of water contaminants, the selective culture conditions without for all that disturbing the redox phenomenon. Referring to classical procedures in isolating the faecal coliforms (lactose medium containing sodium desoxycholate, high incubation temperature), we have managed to detect and selectively enumerate *Escherichia coli* among the bacterial flora of the water samples issued from a natural environment (moderately or high contaminated water: surface water or used water). With a small proportion of the samples analysed (about 6%), *E. coli* is associated to *Klebsiella pneumoniae*. A statistical analysis of the latent potentiometric time in terms of the number of *E. coli* cells present in the samples has led to a regression line giving a satisfactory correlation coefficient (0.95). By extrapolating this regression line to the very weak microbial concentrations it was possible to estimate that in 100 ml of water, 1 *E. coli* would be detected in less than 15 hours.

Thus, it seems possible to apply the potentiometric technique for selectively detecting *E. coli* in waters, even poorly contaminated (drinking water, for example) with a sensitivity comparable to that asserted from other techniques recently developed (impedance measurement, radiometry.). The major assets of potentiometric measurements in presence of LA lies in the reliability and intelligibility of the results (the redox phenomenon being qualitatively and quantitatively studied), associated to a very simple technology.

Furthermore, this technique is perfectly adaptable to other media else than fresh water, such as sea water or biological fluids (blood, urine) and food stuff (milk).

La technique instrumentale proposée participe de l'électrochimie des milieux biologiques; elle mesure par potentiométrie l'activité métabolique microbienne traduisible en termes de dénombrement. La présente communication décrit les modalités d'adaptation à la numération sélective des bio-indicateurs de contamination que sont les "coliformes fécaux", choisis comme paramètre analytique essentiel pour des raisons éco-épidémiologiques (intérêt sanitaire) et pour des raisons métrologiques (facilité de mise en évidence).

PRINCIPE DU PROCÉDÉ POTENTIOMÉTRIQUE

Introduites dans un milieu de culture spécifique "minimal", tamponné, contenant de l'azote minéral et un sucre immédiatement assimilable, de l'oxygène dissous et un coenzyme transporteur d'électrons (acide lipoïque ou thioctique: AL) sous sa forme oxydée, les bactéries, en se multipliant, développent une activité réductrice typique -indiquée par la réduction $AL \rightleftharpoons ALH_2^-$ mesurable en continu par potentiométrie à intensité nulle, à l'aide d'une électrode combinée or/calomel (fig. 1). Les tracés potentiel-temps obtenus présentent une vague de potentiel, chute brutale de l'ordre de 500 mV qui constitue le signal de mesure, précédée par une phase de latence où le potentiel reste constant: ce "temps de latence" (tl) séparant l'instant t_0 de l'inoculation de celui d'apparition du signal est en pratique assimilé au $t(100mV)$ ou $t(100)$: délai au bout duquel le potentiel a chuté de 100 mV, index facile à relever sur les tracés expérimentaux (fig. 2).

Ainsi, pour un très large spectre d'espèces et de concentrations bactériennes, le temps de latence ainsi exprimé est-il une fonction linéaire décroissante du logarithme de la concentration bactérienne initiale: ce résultat est en bon accord avec la réalité expérimentale ainsi que l'ont montré des mesures d'étalonnage effectuées à l'aide de cultures pure d'*E. coli*; les $t(100)$ se répartissent le long d'une droite théorique calculée selon l'équation (2) (fig. 3).

Ainsi se trouve explicité le principe de mesures potentiométriques étalonnables en dénombrements bactériens; il est en outre possible de connaître le temps de génération à partir de la pente de la droite reliant $t(100)$ et $\log x_0$ (3).

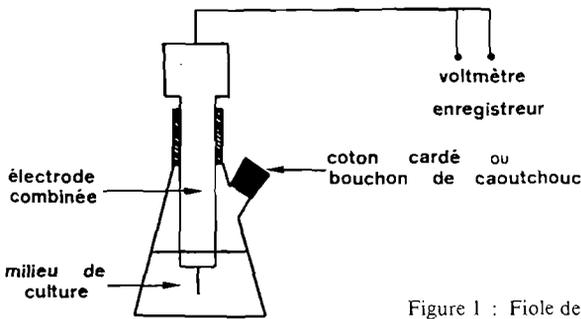


Figure 1 : Fiole de culture et son électrode. (2)

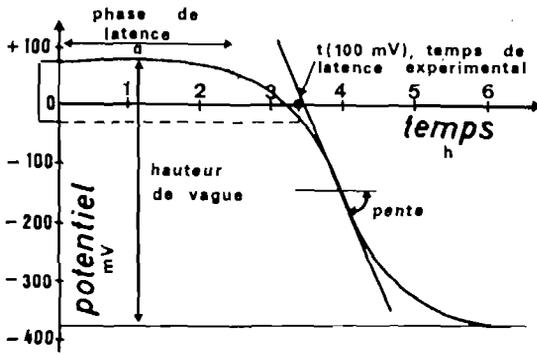


Figure 2 : vague de potentiel et ses caractéristiques géométriques.

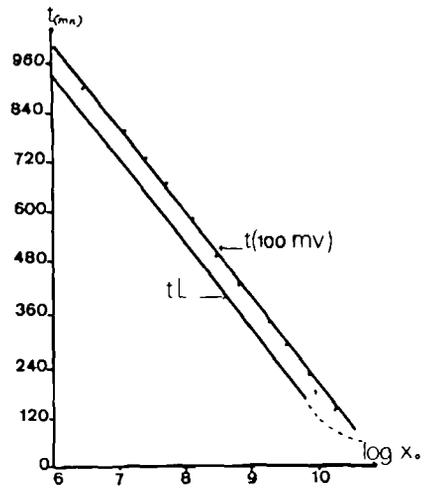


Figure 3 : Représentation du temps de latence (t_l) et de $t(100\text{ mV})$ en fonction de la concentration initiale en cellules bactériennes x_0 .

Application de la technique potentiométrique à la colimétrie des eaux naturelles

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Principe d'application

Il importe de noter que le signal de mesure repose sur un phénomène enzymologique éminemment banal. La détection spécifique des coliformes fécaux suppose donc :

- . la réalisation d'une culture sélective de ces bio-indicateurs, seuls "désignés" par le signal ;

- . la compatibilité des modalités contraignantes de cette sélection avec le modèle électrochimique initial, garante de la fonction dénombrement.

Doit par ailleurs être préservée une sensibilité suffisante, comparable à celle des méthodes conventionnelles et permettant une détection au seuil de la norme de potabilité (1 coliforme dans 100 ml d'échantillon).

La mise à l'épreuve sur les eaux naturelles applique une approche essentiellement comparative : la technique instrumentale est interprétée par référence à la bactériologie classique, d'un point de vue quantitatif pour l'étalonnage des signaux, et d'un point de vue qualitatif quant à l'identité des flores bactériennes détectées.

- Appareillage de mesure (fig. 1)

L'appareillage est celui utilisé dès l'origine des travaux.

Les cultures s'effectuent en fioles Erlenmeyer deux ouvertures de 50 ml pour 35 ml de liquide total (milieu + inoculum) ou 150 ml pour 125 ml de liquide total : le choix de la verrerie dépend de l'importance de la contamination ; les faibles contaminations incitent aux grands volumes d'épreuve pour optimisation de la sensibilité. L'incubation est réalisée en bain-marie à agitation (SBK 25 SALVIS) réglé à 85 mouvements par minute, avec translation 15 mm.

Les mesures de potentiel sont effectuées à l'aide d'électrodes combinées Au-Ag/AgCl, KCl saturé, (AuBe12 TACUSSEL) raccordées à un banc de mesure à six voies constitué par un millivoltmètre à commutateur automatique (CA6 - MVIT - NX TACUSSEL) et un enregistreur par points (192 D BRION-LEROUX). Entre chaque expérience la désinfection des électrodes est effectuée par trempage au moins une heure dans une solution détergente (RBS 25, des Établissements TCS, Lambersart) et rinçage abondant à l'eau distillée stérile.

- Adaptations des conditions de culture

. Milieu de culture. Base minérale : K_2HPO_4 (10.5 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 mg), K_2HPO_4 (3.5 g), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (50 mg), NH_4Cl (0.5 g), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (5 mg), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (50 mg), constituant glucidique : lactose (4 g), adjuvant de croissance : extrait de levure (2 g) milieu tamponné à pH 7, et stérilisé à 120° C pendant 20 mn. Inhibiteur spécifique : désoxycholate de sodium (0.5 g). Indicateur d'oxydoréduction : acide lipoïque (2 mg). Le désoxycholate de sodium et l'acide lipoïque sont ajoutés extemporanément à partir d'une solution préalablement stérilisée par filtration. Le milieu est saturé en O_2 dissous avant usage.

. Incubation. On compare deux températures : 36° C : température "physiologique", 41° C : température "sélective" appliquant la thermotolérance des bio-indicateurs.

. Expérimentation préliminaire sur matériel biologique.

L'expérimentation consiste à comparer les $t(100mV)$ obtenus à partir d'inoculum calibrés ($\log x_0$: 7 à 7.5) d'un grand nombre d'espèces bactériennes représentatives de la flore naturelle de l'eau, cultivées dans les conditions suivantes :

milieu "minimal" lactose - extrait de levure à température 36° C.

milieu "minimal" lactose - extrait de levure à température 41° C.

milieu "minimal" lactose - extrait de levure - désoxycholate de sodium à température 41° C.

Parallèlement, l'expérimentation consiste à étalonner les signaux significatifs donnés par les espèces cultivant normalement -c'est-à-dire sans perturbation apparente- en présence des conditions les plus hostiles : on inocule alors des dilutions d'une suspension mère donnant des $\log x_0$ compris entre 9 et 2, réparties sous volume uniforme de 0.2 ml.

- Essais de colimétrie sur les eaux naturelles

. Étalonage des signaux

L'inoculum est apporté par un volume d'eau à analyser et l'on mesure le $t(100)$ correspondant étalonné par dénombrement manuel conduit parallèlement.

Sont examinés des échantillons d'eaux diversement contaminées : eaux résiduelles (E.U), eaux de surface fortement contaminées (ESC+) ou faiblement contaminées (ESC-), eaux profondes captées ou forées (E.P.) ; ces dernières seules ont fait l'objet de mesures potentiométriques sur des volumes de 100 ml nécessitant des fioles de 150 ml.

La concentration de référence x_0 est déterminée manuellement, soit par inclusion en milieu solide au désoxycholate-lactose pour les E.U. et ESC+ fortement contaminées, soit par filtration sur membrane pour ESC- et E.P. limpides et peu ou pas contaminées.

. Signification bactériologique du signal

L'identification des populations développées dans les fioles de culture et traduites par le signal vise à établir l'analogie entre ces populations et les bio-indicateurs dénombrés sur

les milieux de référence. Les protocoles suivent les schémas classiques d'identification des Entérobactéries (gélose BCP, Kligler, oxydase, galerie API 20 E).

RÉSULTATS

Mise au point d'une culture sélective des bio-indicateurs-compatibilité avec expression électrochimique

- Comparaison du comportement potentiométrique d'espèces représentatives. Le tableau 1 résume les résultats obtenus dans différentes conditions de culture.

	Micro-organisme	Conditions de culture		
		36°C	41°C	41°C + sodium désoxycholate
Groupe I Coliformes fécaux	<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	+++
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	+++	+++
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+++	+++	++
	<i>Enterobacter cloacae</i>	+++	++	++
	<i>Enterobacter hafniae</i>	+++	++	+
	<i>Levinea amalonatica</i>	+++	++	+
	<i>Levinea malonatica</i>	+++	+	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	+++	+	-
Groupe II Coliformes non fécaux	<i>Butiauxella agrestis</i>	+++	-	-
	<i>Enterobacter amnigena</i>	+++	-	-
	<i>Enterobacter intermedium</i>	+++	-	-
	<i>Klebsiella terrigena</i>	+++	-	-
	<i>Kluyvera ascorbata</i>	+++	-	-
	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	+++	-	-
	<i>Serratia fonticola</i>	+++	-	-
	<i>Serratia marcescens</i>	+++	-	-
	<i>Rahnella aquatilis</i>	++	-	-
Groupe III Bactéries Gram négatif non coliformes	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+++	+++	+++
	<i>Acinetobacter sp. strain B5W</i>	+	-	-
	<i>Aeromonas dourgesi</i>	-	-	-
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
	<i>Flavobacterium sp.</i>	++	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-
	<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	-
	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	+	-	-
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	++	-	-
<i>Yersinia frederiksenii</i>	+++	+	-	
Groupe IV Bactéries Gram positif	<i>Bacillus pumilus</i>	+++	+++	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	-
	<i>Streptococcus faecalis</i>	+++	+++	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+	-
	<i>Staphylococcus sp. strain Oxford</i>	++	+	-
	<i>Staphylococcus capitis</i>	++	-	-
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	++	-	-
	<i>Micrococcus sp.</i>	-	-	-

Tableau 1 : Comportements potentiométriques de différentes espèces bactériennes.

+++ signal entre 5 et 10 heures

++ signal entre 10 et 15 heures

+ signal entre 15 et 20 heures

- absence de signal dans les 20 heures.

Lorsque l'on passe de conditions de culture très "physiologiques" (température de 36°C, absence d'inhibiteur) à des conditions très "hostiles" (température 41°C, présence de désoxycholate), on élimine la majeure partie de la flore expérimentée, pour ne retenir que les bio-indicateurs majeurs, c'est-à-dire *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, seules espèces capables de développer en toutes circonstances un signal précoce, entre 5 et 10 heures. On définit ainsi le milieu d'isolement spécifique, pris pour type dans les expériences ultérieures.

Remarque: *Acinetobacter calcoaceticus* fournit une exception notable, en fait non déterminante pour la colimétrie des eaux.

- Essais d'étalonnage avec *Escherichia coli*

On teste, dans les conditions sélectives maximales (41°C, désoxycholate) des suspensions en concentrations décroissantes ($\log x_0$ compris entre 9 et 2) d'*Escherichia coli*.

On obtient une abaque d'étalonnage représentée sur la figure 4: la pente de la droite correspond à un temps de génération p de 25 minutes, conforme à celui obtenu dans les expérimentations antérieures sur le milieu minimal originel. Cette caractéristique suffit à vérifier la compatibilité du modèle électrochimique avec la culture sélective.

Remarque: une expérimentation réalisée dans les mêmes conditions avec *Klebsiella pneumoniae* conduit aux mêmes constatations, avec toutefois un p de 36 minutes, qui "pénalise" cette espèce dans une compétition avec *Escherichia coli* à partir du milieu naturel.

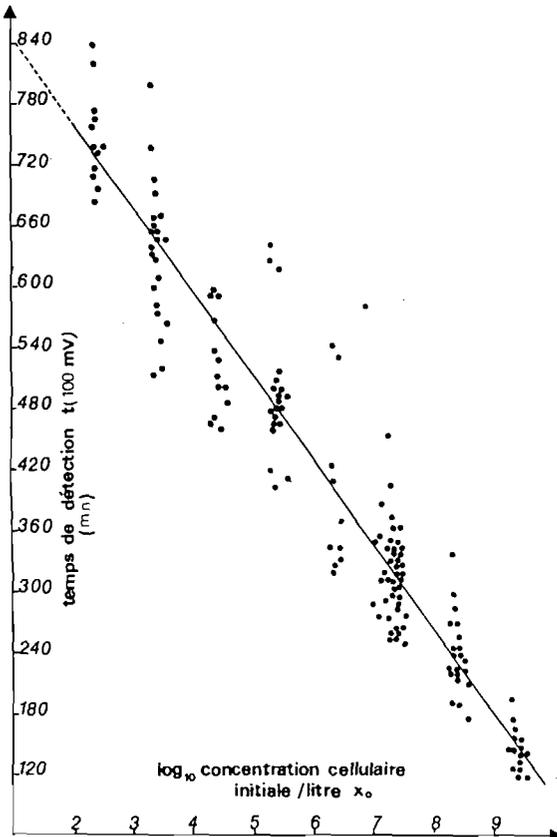


Figure 4 : Étalonnage *Escherichia coli*.

- Conclusions partielles

Cette phase des travaux permet d'avancer les propositions suivantes déterminantes pour les développements ultérieurs :

- . mise au point de conditions de cultures sélectives efficaces : milieu "minimal" lactose-levure-désoxycholate, incubé à 41° C, utilisé désormais systématiquement.
- . compatibilité avec le modèle électrochimique initial démontrée par la constance des données d'étalonnage.
- . spécificité du procédé pour *E. coli*, caractérisée par le temps de génération constamment le plus court, en conditions sélectives maximales. On peut avancer raisonnablement l'hypothèse-d'après l'abaque n° 4- que tout signal développé à partir d'une eau contaminée dans un délai maximum de 15 heures signifiera pratiquement *E. coli*.

Essais de colimétrie instrumentale sur les eaux naturelles

Selon la nature des eaux analysées, deux éventualités se présentent :

- . apparition d'un signal : eaux contaminées, mesures "positives".
- . pas de développement d'un signal : absence de contamination décelable, mesures "négatives".

- Exploitation des données positives globales

Le tableau n° 2 reprend l'ensemble des mesures positives instrumentales dûment étalonnées par méthode manuelle et reportées sur la figure n° 5.

L'ensemble de ces mesures vérifie les notions indissociables et complémentaires suivantes :

- . la constante proportionnalité entre dénombrement instrumental et dénombrement manuel correspondant.
- . la sélectivité de la culture pour *Escherichia coli*, isolé et identifié dans près de 100 % des cas.

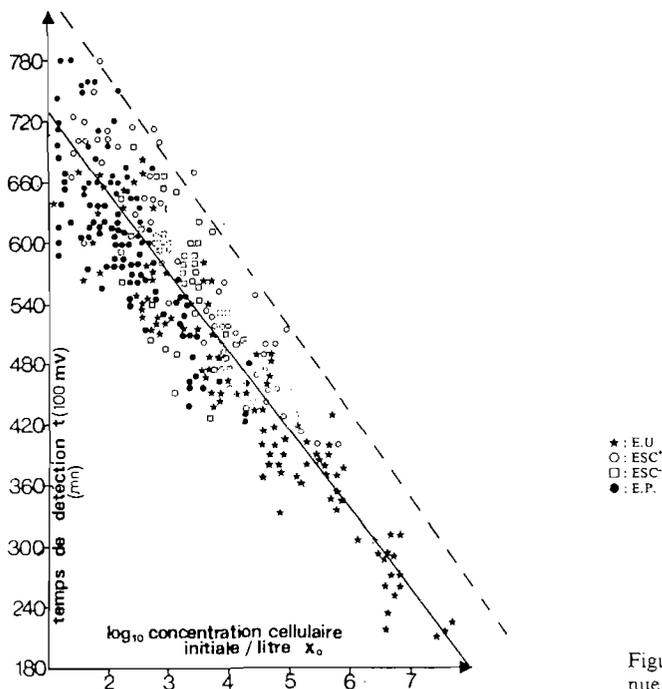


Figure 5 : Abaque d'étalonnage obtenue à partir des eaux naturelles :

	Prél. analysés	Prél. Positifs		Total mesures positives	P	Nombre Isolements	Positif <i>E. coli</i> seul ou associé	Positif <i>E. coli</i>	% <i>E. coli</i> *
		Potential	Manuel						
E.U	30	30	30	112	21.2	47	47	0	100
ESC +	31	31	31	120	24.8	96	94	2	97.9
ESC -	38	38	38	67	22.5	60	55	5	91.7
E.P.	554	131	167	200	26.5	171	145	26	84.8
TOTAL	653	270	264	499	22.2	374	341	33	91.2

Tableau 2 : Ensemble des mesures positives instrumentales.

corollairement, l'abaque n° 5 établie sur les 499 mesures positives, est définie par les caractéristiques géométriques déjà décrites pour *Escherichia coli*, en particulier la pente correspondant à un temps de génération de 22,2 minutes.

Cette similitude de p entre abaques 4 et 5 se traduit par le parallélisme des deux droites d'étalonnage : le décrochage de la droite 5 (abaque des eaux) par rapport à celle d'*Escherichia coli* tient à une sous-estimation inévitable de x_0 mesuré par une technique manuelle très sélective, donc aggravant le stress subi par les microorganismes dans l'environnement -alors que les numérations de souches pures, dénuées de tout impératif de sélection, se déroulent en conditions physiologiques.

Par ailleurs l'abaque n° 5 confirme l'identité entre t (100mV) inférieur ou égal à 15 heures et *Escherichia coli* : les signaux tardifs, entre 15 et 20 heures (temps maximum à la limite de négativité) coïncident essentiellement avec l'isolement de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*.

- Fiabilité de la colimétrie instrumentale calée sur les méthodes conventionnelles

La comparaison s'effectue au niveau des prélèvements analysés.

Les eaux contaminées (E.U, ESC+, ESC-) donnent pour 99 prélèvements 97 signaux en moins de 15 heures, et 2 compris entre 15 et 20 heures : les milieux de référence sont tous positifs et la fiabilité s'établit à 100 %.

Les 554 eaux profondes analysées sont contaminées ou non. Les fréquences de détection comparées font l'objet du test de conformité suivant qui distingue les expériences faites sur fiole de 50 et de 150 ml.

	Conventionnel		Instrumental	
	50 ml	150 ml	50 ml	150 ml
Analyses positives	126 (125)	41 (44)	124 (125)	47 (44)
Analyses négatives	254 (255)	133 (130)	256 (255)	127 (130)
Total	380	174	380	174

Tableau 3 : Tableau de contingence des effectifs réels (et théoriques).

Indicateur d'écart α 0,57.

Cette valeur est substantiellement éloignée du maximum tabulaire de 7,815 indiqué pour un seuil de sécurité de 0,05 et 3 degrés de liberté.

L'excellente concordance de ces résultats, confirmée par des taux de récupération en culture de 84.5 % pour *E. Coli* et de 97.7 % pour l'ensemble des coliformes fécaux, définit la fiabilité et la sensibilité de la technique instrumentale, étalonnée sur les méthodes manuelles.

CONCLUSION

La colimétrie instrumentale que nous proposons mérite d'être prise en considération eu égard à la convergence des caractéristiques favorables suivantes :

- culture sélective performante des coliformes fécaux, bio-indicateurs de contamination.
- compatibilité avec le procédé de détection par potentiométrie, appliquant un modèle parfaitement étudié par ailleurs,
- fiabilité de la technique analytique qui en résulte, appliquée aux eaux en nature.

La sensibilité du procédé permet des seuils de détection comparables avec ceux des méthodes conventionnelles : ainsi, les normes actuelles de qualité (par exemple potabilité) peuvent être appliquées sans difficulté.

Cependant, l'efficacité sera multipliée -pour déboucher sur un dispositif d'alerte permanente- grâce à l'automatisation, qui exploitera les avantages spécifiques suivants :

- simplicité du principe : mesure en continu de l'évolution d'un potentiel redox selon une théorie parfaitement au point.
- simplicité du capteur sensible : électrode combinée peu coûteuse, facile à décontaminer (contrairement aux sondes classiques de mesures d'oxygène dissous).

De plus, le procédé permettant des résultats exprimés quantitativement est particulièrement adapté aux études ou surveillances sanitaires de milieux naturellement contaminés (eaux continentales et marines), actuellement rendues aléatoires par les limitations d'échantillonnage propres aux méthodes conventionnelles.

CHARRIÈRE G., JOUENNE T., LEMELAND J.F., SELEGNY E., JUNTER G.A., 1984. Bacteriological analysis of water by potentiometric measurement of lipoic acid reduction : preliminary assays for selective detection of indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 160-166.

JUNTER G.A., 1981. Etude potentiométrique de la réduction de l'acide lipoïque par les cultures de *Escherichia coli* : une technique, sa théorie et ses applications. *Thèse de doctorat d'Etat*. Rouen.

JUNTER G.A., LEMELAND J.F., SELEGNY E., 1980. Electrochemical detection and counting of *Escherichia coli* in the presence of a reducible coenzyme, lipoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 307-316.

JUNTER G.A., SELEGNY E., LEMELAND J.F., 1979. Analyse théorique des variations de potentiel dans les cultures de *Escherichia coli* K 12 en présence d'un transporteur d'électrons. *Ann. Inst. Pasteur.*, 130a: 295-313.

JUNTER G.A., SELEGNY E., LEMELAND J.F., 1982. Evolution with time of the zero-current potential of a gold electrode in *Escherichia coli* cultures supplied with lipoic acid. I. Mathematical modeling and computer simulation. *Bioelectrochem. Bioener.*, 9: 679-697.

LEMELAND J.F., 1977. Mise au point d'une technique d'étude de l'activité métabolique bactérienne par mesure potentiométrique de l'oxydoréduction d'un transporteur d'électrons. Applications fondamentales et pratiques. *Thèse de doctorat d'Etat*. Rouen.

SELEGNY E., LEMELAND J.F., JUNTER G.A., 1978. Mesure de l'activité métabolique microbienne et des phénomènes de transports transmembranaires par analyse potentiométrique de l'oxydoréduction de l'acide lipoïque, dans un milieu de culture minimal. *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* 286: 1261-1264.