

Désinfection dans des réseaux de distribution d'eau potable : efficacité de traitements sur des biofilms et importance des méthodes d'évaluation

Période : février 2010 à août 2010

Aline POISSON

CORRODYS – Laboratoire de Microbiologie – Cherbourg

Mots clés : Biofilms, Désinfection, Diversité microbienne, Eau potable, Micro-organismes Viables Non Cultivables, Unité Formant Colonies

L'adhésion des micro-organismes (bactéries sous forme végétative ou sporulée, levures, moisissures, virus) à la surface de matériaux (polymères, aciers, etc.) ou de particules en suspension est un processus naturel rencontré dans l'environnement. Cette adhésion conduit à la formation d'un biofilm, qui dans la nature est constitué d'un consortium de micro-organismes. Dans la plupart des biofilms, les micro-organismes représentent 10 % du poids sec et la matrice d'EPS⁽¹⁾ produite par eux-mêmes compte 90 % d'eau. Cette matrice leur confère de nombreux avantages par rapport à des micro-organismes libres dans le milieu environnant (micro-organismes planctoniques) notamment une résistance plus forte aux désinfectants.

La présence de biofilms dans les réseaux de distribution d'eau peut conduire à la contamination de l'eau potable. Les conséquences sont importantes sur la santé publique quand les biofilms abritent, au sein de leurs communautés, des micro-organismes pathogènes. La gravité des risques sanitaires varie selon la nature des micro-organismes et leur dose infectante. La dose infectante est la dose minimale d'agents pathogènes viables et cultivables permettant la contamination et le développement de la maladie dans un organisme réceptif. Il faut toutefois rester vigilant car cette dose est estimée en micro-organismes viables et cultivables (ou UFC⁽²⁾) or il a été démontré que de nombreux micro-organismes passent vers un état Viable mais Non Cultivable (VNC⁽³⁾) après exposition à des conditions de stress (ex : présence de désinfectants, diminution des nutriments, etc.). Dans cet état, les cellules sont dans l'incapacité de se diviser et de se développer sur un milieu de culture de laboratoire ; néanmoins elles peuvent être encore viables et avoir conservé leurs potentiels pathogènes.

Dans le cadre de la prévention des risques des réseaux de distribution d'eau, des désinfectants sont utilisés, comme plus particulièrement le chlore libre dont l'efficacité est reconnue. Il apparaît aujourd'hui que les méthodes conventionnelles, utilisées pour évaluer l'efficacité de traitements, ne sont pas représentatives des conditions de terrain puisque les tests sont réalisés avec des micro-organismes de collection plutôt que des micro-organismes « sauvages » ; elles ne tiennent pas compte également de l'existence des micro-organismes VNC après traitement.

Vérification de l'efficacité de la désinfection chimique et des mesures sanitaires dans les réseaux de distribution d'eau des immeubles

Lenz J, Linke S, Gemein S, Exner M, Gebel J. Verification of the efficiency of chemical disinfection and sanitation measures in in-building distribution systems. *Int J Hyg Environ Health*. 2010 ; 213 : 198-203.

Analyse

Une étude allemande a vérifié l'efficacité de désinfectants chimiques sur des biofilms d'eau potable dans des tubes en silicone : chlore libre, dioxyde de chlore, peroxyde d'hydrogène combiné ou non avec de l'argent, de l'acide péracétique ou des acides de fruits selon différents modes de désinfections. Pour simuler des systèmes de distribution d'eau potable et générer des biofilms représentatifs, les auteurs ont développé

un dispositif expérimental qu'ils ont appelé Hygiene-Monitor[®] comprenant des tubes en silicone de diamètre 4 mm et d'épaisseur 1 mm, dans lesquels passe en continu de l'eau potable. Des biofilms se forment dans ces tubes en moins de 50 jours. Il est possible de suivre l'évolution du biofilm en découpant, au cours du temps, des échantillons du tube et en les analysant. Au regard des différences dans l'utilisation des désinfectants, différents modes de traitement ont été testés avec l'Hygiene-Monitor[®] : traitement en continu sur du long terme, traitement ponctuel en dose choc ou un traitement périodique externe par ozone. La concentration des micro-organismes viables et cultivables dans les biofilms avant traitement est supérieure à $1 \cdot 10^6$ UFC/cm² et d'environ $2 \cdot 10^7$ /cm² micro-organismes totaux (viables et non viables). L'étude a montré l'efficacité, en traitement continu, du chlore libre et du dioxyde de chlore, à empêcher la formation d'un biofilm et à réduire après 70 jours le nombre de micro-

organismes viables et cultivables jusqu'à la limite de détection de la méthode utilisée, respectivement à des concentrations de 0,3 et 0,2 ppm. Cependant, quel que soit le traitement chloré, le nombre de micro-organismes totaux est resté supérieur à 1.10^3 micro-organismes par cm^2 .

Concernant les traitements à base de peroxyde d'hydrogène combinés avec de l'argent, de l'acide péracétique ou des acides de fruits, une dose choc de 10 000 ppm permet une réduction, après 4 heures, du nombre de micro-organismes viables et cultivables jusqu'à la limite de détection de la méthode utilisée. Néanmoins, à cette concentration, des micro-organismes totaux sont encore détectés à hauteur de 1.10^5 micro-organismes par cm^2 . La présence et la concentration de micro-organismes totaux restent identiques si le traitement est réalisé sur une durée plus longue. Le choix du mode de traitement (en continu ou en dose choc) dépend du niveau de contamination du réseau mais aussi du besoin immédiat ou non en eau d'un établissement; le traitement en dose choc impliquant l'indisponibilité du réseau pendant la durée du traitement.

En revanche, l'intégration du dispositif à un système d'ozonation conduit à une réduction à la fois des micro-organismes viables et cultivables et des micro-organismes totaux jusqu'à la limite de détection des méthodes utilisées.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'Hygiene-Monitor® peut être utilisé pour démontrer l'efficacité d'un traitement sans avoir à intervenir sur le réseau de distribution. Ces résultats montrent également que dans la plupart des cas, bien qu'aucun micro-organisme viable et cultivable ne soit détecté, des concentrations significatives en micro-organismes totaux sont quantifiées ainsi que la présence de résidus de biofilms à la surface des tubes. Les auteurs soulèvent la question de l'état métabolique des micro-organismes totaux restant dans les biofilms après désinfection : sont-ils encore viables ou non, ou sont-ils viables mais ne sont-ils plus cultivables ? Par ailleurs, aucune corrélation n'a pu être démontrée après traitement entre le nombre de micro-organismes viables et cultivables, totaux et les observations du biofilm au Microscope Electronique à balayage.

Commentaire

Le dispositif expérimental, décrit dans cette étude, a un grand intérêt en santé publique pour la surveillance des réseaux. C'est un système simple, intégrable facilement dans les réseaux de distribution, et permettant la vérification de la désinfection à court et long terme.

Les résultats montrent également l'utilité, en terme d'évaluation des risques, de recourir à des méthodes alternatives aux méthodes conventionnelles, afin de mettre en évidence les micro-organismes Viables et Non Cultivables après l'action d'un désinfectant.

Influence de la diversité de bactéries isolées de l'eau potable sur la résistance des biofilms à la désinfection

Chaves Simões LC, Simões M, João Vieira M. The influence of Drinking Water-Isolated Bacteria Diversity on Biofilm Resistance to disinfection. Appl Environ Microbiol. 2010; doi:10.1128/AEM.00872-1

Analyse

Un certain nombre d'études a montré que des biofilms composés de plusieurs espèces (multi-espèces), isolées de système de refroidissement, étaient plus résistants à la désinfection que ceux formés avec une seule espèce (mono-espèce); la résistance étant liée à la présence de certaines espèces au sein des biofilms. Une équipe portugaise (Simoes *et al.*, 2010) a étudié ce phénomène en testant l'effet de l'hypochlorite de sodium sur des biofilms formés avec une ou plusieurs espèces bactériennes représentatives et isolées, dans leur cas, de l'eau potable: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Methylobacterium sp.*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Sphingomonas capsulata* et *Staphylococcus sp.*

L'efficacité de plusieurs concentrations en hypochlorite de sodium sur différents biofilms a été évaluée par microplaques en polystyrène. Cette méthode permet un screening simple et rapide; le polystyrène ayant de plus des propriétés physico-chimiques de surface similaires à celles des matériaux utilisés dans les réseaux de distribution d'eau potable.

Les résultats montrent que les biofilms multi espèces sont plus résistants à l'élimination et à l'inactivation par l'hypochlorite de sodium que des biofilms mono espèce. Une des hypothèses évoquée par les auteurs est que la densité cellulaire est plus importante dans les biofilms multi espèces comparée à celle de biofilms mono espèce. Ils suggèrent également qu'au sein d'un biofilm multi espèces, ces dernières interagissent les unes par rapport aux autres, conférant au biofilm une meilleure résistance au désinfectant (difficulté du désinfectant à pénétrer la matrice extracellulaire, acquisition de phénotypes de résistance, etc.).

Les résultats révèlent également que lorsqu'*Acinetobacter calcoaceticus* est associée à d'autres espèces, sa présence augmente la résistance du biofilm à la désinfection alors que la souche est sensible à l'hypochlorite de sodium quand elle est seule dans le biofilm. *Acinetobacter calcoaceticus* aurait la capacité de former des co-aggrégats avec la plupart des espèces bactériennes et favoriserait également l'association d'espèces qui ne s'uniraient pas naturellement.

D'après Simoes *et al.* (2010) cette étude est la première à fournir des preuves expérimentales relatives au rôle de la diversité microbienne de biofilms, composés de bactéries isolées de l'eau potable, sur la résistance à la désinfection par l'hypochlorite de sodium.

Commentaire

L'étude met en évidence que l'efficacité d'un traitement dépend de la diversité microbienne présente dans les biofilms. La technique par microplaques, proposée dans cet article, semble être un moyen simple pour réaliser des biofilms en laboratoire représentatifs d'un réseau d'eau potable et tester de façon rapide l'efficacité de traitements désinfectants.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les articles scientifiques, traitant de l'efficacité de désinfectants sur des biofilms, sont nombreux. Ils concernent les réseaux de distribution d'eau potable mais aussi les secteurs de l'industrie agro-alimentaire, médical, etc.

Étant donné l'influence de la diversité microbienne sur la résistance des biofilms à la désinfection (Simoes *et al.*, 2010), il semble nécessaire d'évaluer l'action d'un désinfectant au plus proche des conditions de service, avec des biofilms multi espèces représentatifs des réseaux de distribution. Le dispositif expérimental Hygiene-Monitor[®], développé par l'équipe allemande (Lenz *et al.*, 2010), apparaît un outil adapté pour la surveillance des biofilms *in situ* puisqu'il peut s'intégrer à un réseau et permettre de suivre le développement de biofilms naturels.

L'ensemble des travaux montre également l'importance, en particulier dans le domaine de la santé publique, de prendre en compte les micro-organismes VNC après traitement afin de ne pas surestimer l'efficacité du désinfectant.

Lexique

- (1) EPS : Substances Polymériques Extracellulaires.
- (2) UFC : Unité Formant Colonie, soit le nombre de micro-organismes viables et cultivables.
- (3) VNC : Viables Non Cultivables.

Revue de la littérature

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 623-633.

Publications de référence

Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Ag.* 1999; 11: 217-221.

Giao MS, Wilks SA, Azevedo NF, *et al.* Validation of SYTO 9/Propidium Iodide Uptake for Rapid Detection of Viable but Noncultivable *Legionella pneumophila*. *Microb Ecol.* 2009; 58: 56-62.

Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2003; 51: 249-253.

Olivier JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol.* 2005; 43 spec: 93-100.

Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, *et al.* Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 6: 1842-1851.

Ultee A, Souvatzi N, Maniadi K. Identification of the culturable and unculturable bacteria population in ground water of a municipal water supply in Germany. *J Appl Microbiol.* 2004; 96: 560-568.

Xavier JB, Foster KR. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 876-881.

Yang C, Jiang Y, Huang K, *et al.* Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *Immunol Med Microbiol.* 2003; 38: 265-271.

Autres publications identifiées

Loret JF, Greub G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health.* 2010; 213: 167-175.

Publication intéressante en termes de diversité des biofilms de l'eau potable.

Roeder RS, Lenz J, Tarne P, *et al.* Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms. *Int J Hyg Environ Health.* 2010; 213: 183-189.

Publication intéressante en termes d'impact de la désinfection sur les peuplements au sein d'un biofilm.

Wong WC, Dudinsky LA, Garcia VM, *et al.* Efficacy of various chemical disinfectants on biofilms formed in spacecraft potable water system components. *Biofouling.* 2010; 26: 583-586.

Seule la méthode de revivification des micro-organismes viables et cultivables est utilisée après exposition aux désinfectants pour évaluer leur efficacité.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Biofilms, Désinfection, Drinking water.