
ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE TECHNIQUES DE DÉSINFECTION UTILISÉES EN MILIEU THERMAL SUR UN RÉSEAU D'EAU MINÉRALE NATURELLE PILOTE

S PÉCASTAINGS^{1,2}, KM DUBOURG², C ROQUES¹

Résumé

La composition physico-chimique d'une eau minérale naturelle lui confère des propriétés favorables à la santé. Selon la réglementation française, cette eau doit avoir la même composition et le même degré de pureté à l'origine et au point d'usage. En conséquence, aucun désinfectant résiduel ne peut être utilisé pour traiter une eau minérale naturelle. Il est donc primordial de bien entretenir les réseaux de canalisation d'eau minérale naturelle afin de limiter la prolifération microbienne et éviter le développement du biofilm. Les travaux présentés ici nous ont permis de déterminer la sensibilité *P. aeruginosa* et de *L. pneumophila* aux traitements de désinfection (choc thermique ou choc chimique). Nous avons pour cela utilisé un véritable réseau, alimenté en eau minérale naturelle de Dax, nous permettant de nous rapprocher au maximum des conditions au sein d'un établissement thermal.

Les épisodes de désinfection par chocs chimique ou thermique se sont révélés très efficaces contre *P. aeruginosa*, puisque immédiatement après désinfection, aucune unité formant colonie (UFC) n'a été détectée dans l'eau minérale naturelle en circulation. Toutefois, une recontamination rapide a été constatée 4 ou 7 jours après la désinfection. En ce qui concerne *L. pneumophila*, les analyses ont montré que la contamination se maintenait dans le réseau malgré deux chocs thermiques effectués à une semaine d'intervalle.

Le modèle de réseau utilisé lors de ces essais constitue un bon outil d'évaluation des protocoles d'entretien des réseaux, permettant d'explorer à la fois l'impact immédiat et à distance de la phase de traitement. Ce modèle nous a permis de montrer l'efficacité limitée des traitements mis en œuvre. Il serait à présent intéressant de modifier et de coupler les protocoles de désinfection afin d'améliorer la rémanence des traitements et donc maintenir durablement la qualité de l'eau thermale.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, eau minérale, désinfection, microbiologie, étude pilote.

Abstract

Evaluation of disinfection techniques used in thermal spa establishments via a mineral water pilot system.

The physical and chemical properties of natural mineral water are at the origin of its importance to health. According to French law, mineral water must have the same chemical composition

¹ Université de Toulouse ; UPS, LU 49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex 9, France

² Institut du thermalisme - Université Victor-Segalen-Bordeaux2, 8 rue Sainte Ursule, 40100 Dax, France
Courriels : sophie@pecastaings.net ; karine.dubourg@u-bordeaux2.fr ; christine.roques@cict.fr

and the same purity from the source to the point of use. Hence, no residual disinfectant can be used to treat a natural mineral water, and good maintenance is crucial in limiting microbial proliferation and avoiding biofilm development. This work aimed to determine the sensitivity of *P. aeruginosa* and *L. pneumophila* to disinfection treatments. For that purpose, we used a real water pipe system, containing natural mineral water from Dax (France), mimicking conditions found in a thermal spa establishment.

Two types of treatments were tested on the contaminated water system : thermal disinfection and chemical disinfection. Contamination consisted either of *P. aeruginosa* or *L. pneumophila*. Treatment efficacy was determined by numerating *P. aeruginosa* or *L. pneumophila* in the freely circulating natural mineral water, before and after treatment. Chemical or thermal disinfections were effective in the short term against *P. aeruginosa* ; immediately after treatment, no CFU were detected in the natural mineral water. However, recontamination was found 4 or 7 days after treatment. Thermal disinfection alone was tested on *L. pneumophila*. Quantitative PCR analysis showed that contamination remained in the water system, eventhough 2 thermal disinfections were made. This model of a water pipe system is a good tool for the evaluation of disinfection protocols used in thermal spa establishments, allowing us to assess both immediate and long-term treatment impact. This model allowed us to show the limited efficacy of tested treatments. It would now be of relevant interest to modify and couple disinfection protocols in order to improve treatment remanence and maintain sustainable water quality.

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, mineral water, water microbiology, pilot study.

1. Introduction

Un mauvais entretien des réseaux de canalisations d'eau peut être lourd de conséquences pour les établissements thermaux. L'eau minérale naturelle (EMN) qui circule dans les réseaux des établissements thermaux a des caractéristiques particulières, une composition physico-chimique et microbiologique spécifique qui lui confère des propriétés favorables à la santé [1]. Pour ne pas altérer leurs caractères naturels, ces eaux ne peuvent pas faire l'objet de traitements chimiques (chloration par exemple) avant utilisation aux postes de soins de l'établissement thermal : la composition physico-chimique de l'eau doit être la même à l'émergence et aux points d'usage [2].

Par conséquent, pour éviter la détérioration de la qualité de l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux, il est nécessaire d'assurer une bonne maintenance des réseaux de canalisations [3]. Il s'agit notamment de limiter les dépôts (tartre, micro-organismes) et la corrosion en effectuant des opérations de nettoyage et de désinfection régulières. Ces opérations de maintenance doivent notamment permettre de limiter, voire d'éliminer le biofilm, communauté bactérienne fixée sur les canalisations. En France, la réglementation du 19 juin 2000 décrit les techniques de nettoyage et de désinfection applicables aux réseaux d'EMN [4].

Deux micro-organismes font l'objet d'une surveillance accrue dans les établissements thermaux : *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila*.

P. aeruginosa est une bactérie ubiquiste souvent rencontrée dans les milieux humides où elle forme des biofilms. Elle représente un risque sanitaire pour les personnes fragilisées,

immunodéprimées. En tant que pathogène opportuniste, il est à l'origine d'une grande variété d'infections : auriculaires, oculaires, urinaires, infections de la peau ou des voies respiratoires [5].

L. pneumophila est l'agent étiologique de la fièvre de Pontiac et de la maladie du Légionnaire. Ce bacille à Gram négatif est fréquemment isolé en eaux douces et a la capacité de coloniser les systèmes d'eaux artificiels où il peut poser de graves problèmes sanitaires. Dans l'environnement, cette bactérie a développé un mode de multiplication original, à l'intérieur de cellules de protozoaires qu'elle lyse avant de coloniser d'autres cellules. Ce système de multiplication est probablement à l'origine de la pathogénicité de *L. pneumophila* chez l'homme. *L. pneumophila* a en effet la capacité de se multiplier dans les macrophages pulmonaires, causant une pneumopathie parfois létale [6].

Les techniques de désinfection des réseaux d'EMN dont il est question ici font l'objet de validations, avant leurs mises sur le marché, qui permettent de vérifier si elles répondent à certains critères d'efficacité sur des micro-organismes problématiques (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) [7]. Cependant ces méthodes de validation *in vitro* ne prennent pas toujours en compte la particularité des conditions micro-environnementales (température, pH, charge minérale, dépôts de tartre ou corrosion), ni la complexité des communautés microbiennes des réseaux d'EMN (biofilm). L'originalité de ce travail réside donc dans l'évaluation *in situ* de méthodes de désinfection utilisées en milieu thermal, grâce à un outil de recherche conçu spécifiquement, un réseau pilote "eau thermale". Ce pilote a été artificiellement contaminé par *P. aeruginosa* ou *L. pneumophila* puis des protocoles de désinfection ont été appliqués et évalués et leur efficacité à court et moyen termes évaluée.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches bactériennes

***Pseudomonas aeruginosa*.** La souche utilisée est un isolat environnemental, isolé par la méthode de détection de *P. aeruginosa* (norme NF EN 12780 [8]) dans un réseau d'eau chaude. La souche a été conservée dans du bouillon Eugon (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) additionné de 15 % de glycérol à - 80°C. Avant les essais, les cultures stock ont été repiquées moins de 3 fois sur gélose TSA (Trypcase Soja Agar, bioMérieux). Une suspension pour l'inoculation du réseau a été réalisée en effectuant une culture dans 200 mL de milieu R2A liquide [9], maintenue à 37°C et agitée par agitateur magnétique (400 rpm) pendant 12h. Le milieu a alors été éliminé par centrifugation de la suspension à 3400 trs/min (15 min) et le culot bactérien a été repris dans 200 mL d'eau déminéralisée (opération renouvelée 3 fois), immédiatement avant le transfert de la suspension bactérienne dans le ballon du réseau "eau thermale". La concentration bactérienne s'élevait alors à $8,0 \times 10^8$ UFC/mL.

***L. pneumophila*.** La souche utilisée dans cette étude est un isolat environnemental isolé par la méthode NF T 90-431 à partir d'une eau de surface. La souche a été conservée dans du bouillon Eugon additionné de 15 % de glycérol à - 80°C. Avant les essais, les

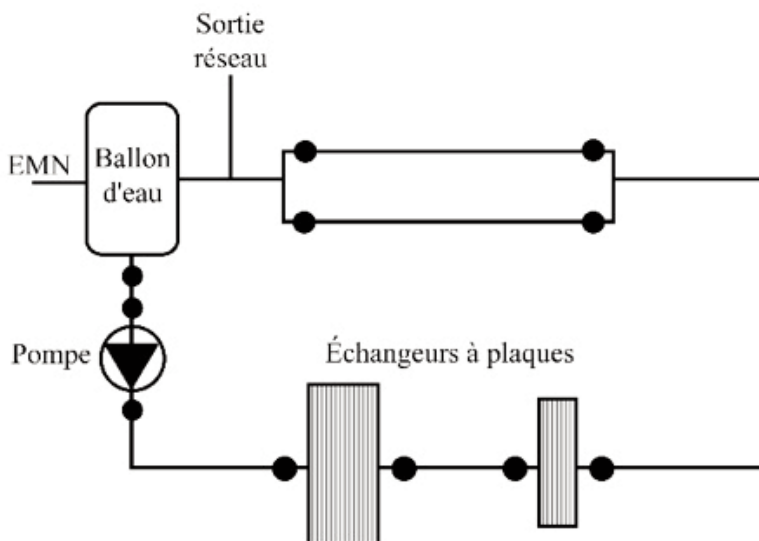
cultures stock ont été repiquées moins de 3 fois sur gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), incubée à 37°C pendant 72 h. Une suspension pour l'inoculation du réseau a été réalisée en préparant une culture dans 50 mL de milieu YEB (Yeast Extract Broth, stérilisé par filtration sur membrane, [10]), maintenue à 37°C et agitée (400 rpm) pendant 24 h. Cette suspension a servi à inoculer 1 litre de milieu YEB incubé à nouveau pendant 12 h. Le milieu a alors été éliminé de la suspension par centrifugation à 3400 trs/min (15 min) et le culot bactérien a été repris dans 300 mL d'eau déminéralisée (opération renouvelée 3 fois), immédiatement avant le transfert de la suspension bactérienne dans le ballon du réseau "eau thermique". La concentration bactérienne s'élevait alors à $6,1 \times 10^6$ UFC/mL.

2.2. Réseau pilote "eau thermique"

Le réseau pilote "eau thermique" (figure 1) peut être alimenté soit en EMN de Dax ($\text{Na}^+=128.9$ mg/L, $\text{K}^+=20.8$ mg/L, $\text{NH}_4^+=0.2$ mg/L, $\text{Ca}^{2+}=127.0$ mg/L, $\text{Mg}^{2+}=35.0$ mg/L, $\text{SO}_4^{2-}=432.1$ mg/L, $\text{Cl}^-=153.9$ mg/L, $\text{Fe}^{2+}=0.08$ mg/L, $\text{pH}=7.4$), soit en eau du réseau d'adduction publique. Il est constitué d'inox 316L (acier au chrome, nickel et molybdène). Le ballon d'eau a une capacité de 500 litres et est équipé d'une résistance chauffante permettant les désinfections par chocs thermiques (élévation de la température à 80°C). La mise sous pression de l'eau est assurée par une pompe à débit variable ajustée pour les essais à 3600 ± 100 L/h. Les échangeurs à plaques abaissent la température de l'EMN de 60,1°C (au niveau du ballon) à 38°C (après le 1^{er} échangeur) puis à 28°C (après le 2nd échangeur). Lors des essais, le circuit a été utilisé en système ouvert une heure par jour pour mimer une utilisation quotidienne.

Figure 1. Schéma du réseau pilote "eau thermique".

Les points représentent les points de prélèvements.



Après avoir versé la suspension bactérienne appropriée (*P. aeruginosa* ou *L. pneumophila*) dans le ballon préalablement rempli d'EMN refroidie (40°C), l'eau contaminée a été mise en circulation pendant 30 min (système fermé, avec retour de l'eau en fin de réseau vers le ballon) puis laissée en mode statique pendant 48 h.

2.3. Essais de désinfection du pilote

Le choc thermique a été réalisé en remplissant le ballon de 400 L d'eau du réseau d'aduction de la ville de Dax (température = 24±2°C). Cette eau a été chauffée pendant 5 h jusqu'à ce que la température atteigne 80°C dans le ballon et au moins 70±5°C dans le reste du réseau. L'eau a été mise en circulation dans le pilote "eau thermale" pendant 1 h (réseau fermé). En fin de manipulation, le pilote est vidangé et rincé pendant 5 min avec de l'EMN [4].

Le PolyHexaméthylène Biguanide (PHMB) a été utilisé dans le cadre d'un protocole de désinfection chimique, à une concentration de 25 mg/L dilué d'eau de ville (T°=24±2°C), au niveau du ballon du pilote "eau thermale". Cette solution a ensuite été mise en circulation dans le pilote pendant 1h15 (réseau fermé). Après cet épisode de désinfection, le pilote a été rincé avec de l'EMN pendant 30 minutes.

2.4. Prélèvements d'eau minérale naturelle

Onze points de prélèvements flambables permettent de prélever l'eau en amont et en aval des principaux éléments du réseau "eau thermale" (ballon, pompe, échangeurs). Après élimination du premier jet, les robinets de prélèvements sont flambés pendant quelques secondes. L'EMN a été collectée dans des flacons de polyéthylène haute densité de 1 L (ADL Prochilab), stérilisés par ionisation et ne contenant pas de neutralisant. Les échantillons d'eau ont été analysés dans les 24 h suivant le prélèvement ou après 48 h avec conservation de l'échantillon à 4°C.

2.5. Analyses de la contamination microbiologique dans le réseau "eau thermale"

Tout au long des essais, la contamination du réseau a été déterminée par des analyses microbiologiques de l'EMN en circulation dans le réseau, aux 11 points de prélèvements.

Les méthodes utilisées étaient celles préconisées par les normes AFNOR à la date de l'étude. Selon la réglementation du 19 juin 2000, relative à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux, aucun micro-organisme pathogène ou de contamination fécale ne doit être détecté dans 250 mL d'eau par ces méthodes d'analyses.

La flore totale hétérotrophe revivifiable (à 22 et 37°C) [11], les coliformes totaux et thermotolérants [12], les entérocoques [13] et les spores de bactéries anaérobies sulfitoréductrices [14] ont été recherchés dans le réseau "eau thermale" durant toute la durée des essais, afin de vérifier l'absence de contamination extérieure anormale.

P. aeruginosa. Les analyses ont été effectuées en filtrant 250 mL d'EMN échantillonnée sur une membrane en ester de cellulose stérile de porosité nominale 0,45 µm. La membrane a été transférée sur milieu CN (Oxoïd) et incubée 48 h, à 37°C. Les colonies présumées de *P. aeruginosa* (bleues à vertes) ont été examinées sous lampe UV (360 nm)

pour vérifier leur fluorescence. Elles ont ensuite été repiquées dans un bouillon acétamide pour vérifier leur capacité à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide [8].

Légionelles [15]. Les analyses ont été effectuées selon la norme en filtrant 1 litre d'EMN échantillonnée sur membrane stérile en polycarbonate de porosité nominale 0,45 µm. L'ADN des cellules récupérées sur les membranes a été extrait selon les instructions du fabricant (Genesystems), en utilisant l'appareil Genextract et le kit d'extraction correspondant (Genesystems) : les cellules ont été lysées par sonication (251 watts, 40 Hz, 20 min) et traitement à la chaleur (100°C, 10 min). L'ADN a été purifié sur colonne de silice et élué avant de procéder à une PCR quantitative. Les échantillons d'ADN ont été mélangés au mix de PCR (Genesystem) et analysés en triplicata. Un contrôle positif et négatif de PCR a été réalisé pour chaque échantillon. Un contrôle négatif a été réalisé pour chaque série d'extraction. Les courbes de calibration ont été réalisées avec de l'ADN de *L. pneumophila* (GeneSystems).

3. Résultats

3.1. Détermination de l'activité bactéricide du choc thermique et d'un choc chimique (PHMB) sur une contamination par *P. aeruginosa* dans le réseau "eau thermale"

3.1.1. Désinfection par choc thermique à 80°C

Des essais préliminaires menés *in vitro* ont permis de vérifier que le choc thermique à 80°C était efficace sur cellules planctoniques ou en biofilm (données non présentées) : une élévation de température à 70°C pendant 5 minutes permet l'élimination d'au moins 5 log d'UFC.

Les tests concernant l'efficacité du choc thermique à 80°C ont été menés sur pilote "eau thermale" inoculé par *P. aeruginosa*. Aucune contamination par des coliformes, des entérocoques ou spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices n'a été détectée lors de ces essais, que ce soit avant ou après le choc de désinfection.

P. aeruginosa a été détecté dans le réseau "eau thermale" après inoculation de la bactérie, aux 11 points de prélèvements (4,89x10³ UFC/mL en moyenne, voir tableau I). Immédiatement après la désinfection, les concentrations de *P. aeruginosa* étaient inférieures au seuil de détection dans tout le réseau (1 UFC/250 mL). Toutefois, une semaine après la désinfection, *P. aeruginosa* a de nouveau été détecté au niveau de 4 points de prélèvement : les points 5 à 8 présentaient notamment des concentrations en *P. aeruginosa* supérieures à 150 UFC/250 mL.

3.1.2. Désinfection par le PHMB

Des tests menés *in vitro* sur la bactérie *P. aeruginosa* ont permis de vérifier que ce produit était bactéricide à différentes concentrations (20, 25, 30, 35 mg/L) après 1 heure de traitement sur cellules planctoniques (données non fournies).

Lors de cet essai, le pilote a été inoculé par *P. aeruginosa*, puis une désinfection par PHMB a été appliquée (concentration 25 mg/L, dans de l'eau d'adduction potable),

Tableau I : Concentration en *P. aeruginosa* dans le pilote “eau thermale” inoculé, avant et après désinfection par choc thermique à 80°C

Points de prélèvements	Concentration en <i>P. aeruginosa</i> (UFC/250 mL)		
	Avant désinfection	24 h après désinfection	7 j après désinfection
1	3,98x10 ⁶	-	-
2	2,13x10 ⁶	-	-
3	3,25x10 ⁶	-	-
4	5,00x10 ⁶	-	-
5	1,25x10 ⁶	-	>150
6	1,68x10 ⁶	-	>150
7	4,00x10 ⁶	-	>150
8	1,25x10 ⁶	-	>150
9	7,50x10 ⁶	-	-
10	5,00x10 ⁶	-	-
11	4,53x10 ⁶	-	-

- : concentration inférieure au seuil de détection (<1 UFC/250 mL)

pendant 1h15 min. Après désinfection, le réseau a été rincé par de l'EMN puis de l'EMN neuve a été mise en circulation quotidiennement.

Après inoculation du pilote, la concentration moyenne en *P. aeruginosa* aux 11 points de prélèvements était de 5,86x10² UFC/250 mL (tableau II). Trois jours après la désinfection, aucune bactérie de l'espèce *P. aeruginosa* n'a été détectée dans le réseau. Cependant, dès le quatrième jour suivant la désinfection, des concentrations dépassant les taux acceptables ont été constatées au niveau de trois points de prélèvements.

Tableau II : Répartition de la contamination par *P. aeruginosa* dans le pilote “eau thermale” inoculé après désinfection par le PHMB

Nombre de points de prélèvements contaminés (concentration en <i>P. aeruginosa</i> en UFC/250 mL)		
Avant désinfection	3 jours après désinfection	4 jours après désinfection
11 (5,86x10 ²)	0	3 (21)

3.2. Détermination de l'activité bactéricide du choc thermique sur une contamination de *L. pneumophila* dans le réseau “eau thermale”

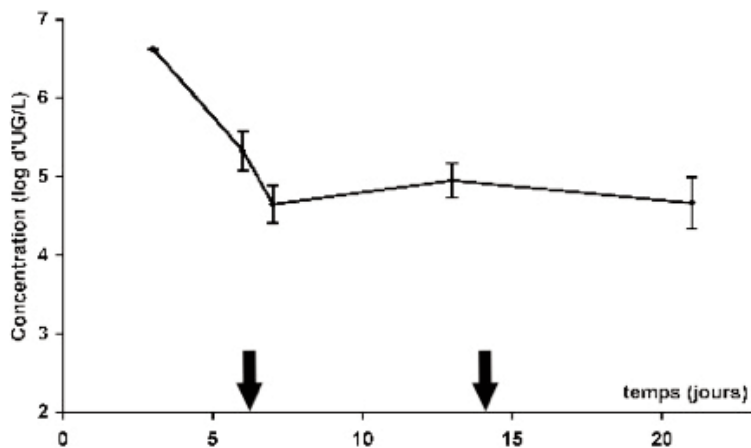
Lors de cet essai, le réseau a été inoculé par *L. pneumophila* puis deux désinfections par choc thermique (80°C) ont été appliquées avec de l'eau d'adduction potable, pendant 1 h (à 6 et 13 jours). Après ces chocs de désinfection, le réseau a été rincé par de l'EMN puis de l'EMN neuve a été mise en circulation quotidiennement. La concentration en

L. pneumophila aux points de prélèvements a été déterminée par PCR quantitative, par 5 séries d'analyses suivant la contamination initiale.

La figure 2 montre l'évolution de la concentration en *L. pneumophila* dans le réseau pendant 21 jours. Au cours de la première semaine suivant l'inoculation, la concentration en *L. pneumophila* circulant dans le réseau passe de 6,62 log d'UG/L à 5,33 log d'UG/L. Un choc thermique a été réalisé au jour 6. Les analyses avant et après choc montrent que la concentration en *L. pneumophila* dans le pilote a diminué de moins d'1 log d'UG/L ($4,65 \pm 0,21$ log d'UG/L). Cette diminution est cependant difficilement imputable au choc thermique et semble résulter de la diminution naturelle de la concentration en légionelles dans l'eau du réseau. Les analyses d'eau ultérieures (à 13 et 21 j.) montrent que la concentration en légionelles n'a pas varié et reste supérieure à 4 log d'UG/L et ce malgré un nouveau choc thermique à 14 j.

Figure 2. Évolution de la concentration en *L. pneumophila* en log d'UG/L dans le réseau "eau thermale" au cours du temps (n=11).

Les flèches représentent les épisodes de désinfection par choc thermique.



4. Discussion

4.1. Efficacité du choc thermique

Lorsque le pilote est artificiellement contaminé par *P. aeruginosa*, un choc thermique à 80°C permet une bonne élimination temporaire de la contamination (aucun *P. aeruginosa* n'a été détecté dans l'eau après désinfection). Ce résultat correspond aux résultats des essais *in vitro* selon la norme NF EN 1040 qui ont montré qu'un choc thermique de 60 min à 70°C permettait d'éliminer 10^6 UFC de *P. aeruginosa*. En revanche, la recontamination du pilote à la suite du choc thermique est rapide : 7 jours après la désinfection, 4 points de prélèvement sont contaminés par *P. aeruginosa*, à des concentrations

supérieures à 150 UFC/250 mL, valeurs non acceptables selon la réglementation du 19 juin 2000.

D'après la littérature, *P. aeruginosa* présente une faible résistance à la chaleur [16] et des études menées en réseau hospitalier montrent qu'il est possible d'éliminer la bactérie en effectuant des traitements thermiques hebdomadaires [5]. Toutefois, *P. aeruginosa* a la capacité de former des biofilms, ce qui lui permet de mieux résister aux chocs biocides que des bactéries planctoniques [17]. Cappelli et al. ont étudié plusieurs techniques pour désinfecter un système d'hémodialyse contaminé par un biofilm de *P. aeruginosa*. Pour eux, la désinfection thermique s'est révélé être la moins efficace des méthodes testées [18]. Lors de nos essais, il est possible qu'un biofilm se soit développé au sein du pilote, entraînant ainsi une baisse de l'efficacité de la désinfection et une recontamination rapide de l'eau du réseau.

En ce qui concerne *L. pneumophila*, les concentrations d'UFC en suspension ont été obtenues par PCR quantitative. Les résultats montrent que les chocs thermiques appliqués sur le réseau "eau thermale" ne permettent pas d'éliminer une contamination par cette bactérie. Les données de la littérature montrent toutefois qu'une augmentation de la température au-delà de 60° permet l'inactivation de *L. pneumophila* dans un réseau d'eau [19].

Il est à noter que la concentration de *L. pneumophila* a été évaluée par PCR quantitative uniquement. Des mesures par culture sur milieux GVPC ont été effectuées, mais étaient inexploitable (légionelles détectées et non-quantifiables ou non dénombrées du fait de la présence d'une flore interférente importante). La technique de PCR quantitative permet de dénombrer les bactéries viables au sein d'un réseau mais également les bactéries viables non cultivables ainsi que les bactéries mortes (dont l'ADN intact reste en suspension dans l'eau du réseau après désinfection). D'autres essais devraient être effectués pour valider la corrélation entre les résultats obtenus par PCR quantitative et par culture sur milieu GVPC. Toutefois, les quantifications effectuées au jour 13 (8 j. après le premier choc thermique) et au jour 21 (7 j. après le second choc thermique) ne prennent probablement pas en compte les bactéries mortes après les épisodes de désinfection, leur ADN ayant très probablement été dégradé durant ce laps de temps.

Il est à noter que tous ces essais ne permettent de quantifier que les bactéries planctoniques, en suspension dans l'EMN en circulation. Il serait intéressant de vérifier l'impact des traitements biocides sur les bactéries adhérentes (biofilms) fixées sur les canalisations.

4.2. Efficacité du choc chimique (PHMB)

La désinfection par le PHMB a permis d'éliminer provisoirement la contamination par *P. aeruginosa* dans le réseau "eau thermale". En effet, trois jours après la désinfection, aucun *P. aeruginosa* n'était détecté (voir tableau II) et l'eau répondait donc aux critères de qualité imposés par la réglementation du 19 juin 2000. Ce résultat concorde avec les résultats obtenus lors d'essais de bactéricidie *in vitro* qui montrent que des concentrations de 20 à 35 mg/L de PHMB permettent d'éliminer 10⁶ UFC de *P. aeruginosa* planctoniques. Cependant, 4 jours après la désinfection, *P. aeruginosa* était de nouveau détecté en trois points du pilote. Comme pour le choc thermique, la recontamination est très rapide. La résistance aux agents antibactériens (biocides et antibiotiques) des

bactéries au sein de biofilms est un phénomène bien décrit dans la littérature [20]. Il est possible que les bactéries inoculées aient formé un biofilm ou colonisé un biofilm déjà mis en place dans le réseau. Ainsi, le PHMB aurait eu une bonne activité sur les bactéries planctoniques, mais une activité partielle sur le biofilm, à l'origine de la recontamination du réseau. En outre, une étude récente montre que les *Pseudomonadaceae* au sein d'un microcosme sont peu sensibles au PHMB [21].

Pour améliorer les résultats, de nouveaux essais pourraient être menés, en modifiant le protocole de désinfection par le PHMB (concentration d'utilisation et temps de contact). Il serait également intéressant de coupler cette méthode de désinfection avec un choc thermique, par exemple.

5. Conclusion

Les résultats de ces essais montrent que les traitements de désinfection testés sur le réseau pilote contaminé par la bactérie *P. aeruginosa* ont une bonne efficacité immédiate : après traitements, aucune bactérie n'a été détectée dans l'eau minérale naturelle en circulation. Toutefois, la recontamination du réseau a été observée en moins d'une semaine, quel que soit le traitement appliqué. Il serait intéressant de coupler plusieurs méthodes de désinfection ou d'augmenter les concentrations en biocides testées afin d'avoir un meilleur impact sur le biofilm et éviter la détérioration rapide de la qualité de l'eau.

En ce qui concerne *L. pneumophila*, la contamination du réseau a été maintenue pendant les essais, sur une période de 3 semaines. L'application de deux traitements thermiques n'a pas permis d'abaisser la concentration en *L. pneumophila*. D'autres traitements doivent à présent être testés pour permettre un retour à une qualité d'eau acceptable.

Remerciements

Sophie Pécastaing remercie l'Afreth (Association française pour la recherche thermale) pour la bourse de jeune chercheur qui lui a été octroyée, ainsi que le Conseil général des Landes. Les auteurs expriment leur gratitude envers la société Genesystems (Bruz, France), qui a mis à disposition un appareil GeneExtract et un GeneDiscCycler et fourni les réactifs nécessaires aux analyses par q-PCR.

Références

1. Décret n° 89-369 du 9 juin 1989 relatif aux eaux minérales naturelles et aux eaux potables préemballées, in *Journal Officiel* 1989:7202-7205.
2. Décret n°57-404 du 28 mars 1957 portant règlement d'administration publique sur la police et la surveillance des eaux minérales, in *Journal Officiel* 1957:3346-3348.
3. Popoff G. Les bonnes pratiques d'exploitation des eaux minérales dans un établissement thermal. *Press Therm Climat* 1992;129,3:192-201.
4. Circulaire DGS/VS 4 n° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux. 2000.
5. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005;33,5 Suppl 1:S41-9.
6. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease : 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15,3:506-26.

7. AFNOR, NF EN 1040. Antiseptiques et désinfectants chimiques : essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et désinfectants chimiques. 2006.
8. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane, in NF EN 12780. 2002.
9. Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 1985;49,1:1-7.
10. Ristroph JD, Hedlund KW, Gowda S. Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *J Clin Microbiol* 1981;13,1:115-9.
11. Dénombrement des micro-organismes revivifiables, in EN ISO 6222. 1999.
12. Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes, in NF EN ISO 9308-1. 2000.
13. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux, in NF EN ISO 7899-2. 2000.
14. Recherche et dénombrement de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*), in NF EN 26461-1, ISO 6461-1. 1993.
15. AFNOR, XP T90-47. Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). 2006.
16. Spinks AT et al. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Res* 2006;40,6:1326-32.
17. Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 2000;88,1:22-30.
18. Cappelli G et al. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18,10:2105-11.
19. Kim BR et al. Literature review - Efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 2002;36,18:4433-44.
20. Campanac C et al. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46,5:1469-74.
21. Moore LE et al. *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl Environ Microbiol* 2008;74,15:4825-34.