
VALIDATION DES SÉQUENCES DE NETTOYAGE ET DÉSINFECTION DES PIÈCES AMOVIBLES DE POSTES DE SOINS À L'ÉGARD DES BIOFILMS DE *P. AERUGINOSA*

**PESSEREAU COLINE^{1,2}, ANDRÈS YVES³,
DE BENTZMANN SOPHIE⁴, GARREC NATHALIE¹**

Résumé

L'entretien des réseaux d'eau thermale est un point crucial dans la maîtrise de la qualité micro-biologique de ces eaux utilisées à des fins thérapeutiques. Les procédures de nettoyage et désinfection sont appliquées en dehors des périodes d'utilisation de l'eau par les curistes par le nettoyage en place (NEP) sur l'ensemble du réseau. Les postes de soins qui ne peuvent pas bénéficier de ce type de traitement sont démontés et traités par une succession d'étapes incluant nettoyage mécanique, nettoyage chimique et désinfection par immersion dans des solutions désincrustantes et désinfectantes. Ces procédures font l'objet d'un ajustement constant, tant au niveau du choix des produits que des temps de contact, pour faire face aux contaminations intermittentes et dispersées. Afin de faciliter la mise en place et l'optimisation de ces procédures, nous avons développé une méthodologie permettant de valider en laboratoire l'efficacité d'une procédure de nettoyage et désinfection à l'égard des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. Pour cela nous avons utilisé un modèle de biofilm avec une souche de *P. aeruginosa* isolée d'un réseau d'eau potable sur des coupons en cuivre, laiton, acier inoxydable 316 L, PE 500, PVC-C et EPDM, dans des conditions de minéralisation forte. La séquence de traitement à valider est appliquée sur ces coupons et son action sur le biofilm est suivie à l'aide de techniques permettant de mesurer son activité métabolique (mesure de l'ATP intracellulaire) et l'importance du dépôt organique (coloration au cristal violet). La présence potentielle de *P. aeruginosa* une semaine après traitement a également été recherchée spécifiquement par le dosage de la pyocyanine et de la pyoverdine et/ou par culture sur milieu gélosé.

Mots-clefs : réseaux d'eau thermale, *P. aeruginosa*, biofilm, validation de procédure de nettoyage et désinfection

1. Centre scientifique et technique du bâtiment, Département CAPE, Division Eau, Pôle Recherche-Expertise, 11 rue Henri Picherit, BP 82341, F-44323 Nantes cedex 3
2. Service Ressources Thermales, 57 rue du Général de Gaulle, F-95880 Enghien-les-Bains
3. GEPEA, UMR CNRS 6144, École des Mines de Nantes, La Chantrerie, 4 rue Alfred Kastler, BP 20722, F-44307 Nantes
4. UMR CNRS 7255, 31 chemin Joseph Aiguier, F-13402, Marseille

Abstract

Validation of cleaning and disinfection procedures applied to removable care outlet against *P. aeruginosa* biofilms

Maintenance of thermal water networks is crucial in controlling the microbiological quality of water used for therapeutic purposes. Cleaning and disinfection procedures based on cleaning-in-place are applied outside the periods of water used by patients. Some terminal point-of-use can not be treated by cleaning-in-place. These are then removed and mechanical cleaning, chemical cleaning and disinfection by immersion in disinfectant solutions are applied. The implementation of these procedures is performed on water network and optimization can be laborious. To facilitate the validation of these procedures against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, we propose a validation assay based on the treatment of a 24h-biofilm obtained on 6 different materials. Biofilms of *P. aeruginosa* strain ST111 were developed in 24 hours on copper, brass, stainless steel, PE 500, EPDM and PVC-C coupons, in high mineralization conditions. The procedure to be validated is applied on each biofilm and the efficiency of procedure towards deposit and biological activity is assessed using crystal violet staining and intracellular ATP measurement. Specific efficiency towards *P. aeruginosa* biofilm is assessed using cultural method and measurements of specific virulence factors (pyoverdine and pyocyanin).

Key words : thermal water networks, *P. aeruginosa*, biofilm, cleaning and disinfection procedures

Introduction

Du fait de leur utilisation thérapeutique et de leurs formes d'administration (inhalation, aérosolisation, ingestion), les eaux thermales se doivent d'être exemptes de micro-organismes pathogènes et sont à ce titre soumises à des contrôles de qualité microbiologique très stricts. La composition des eaux minérales naturelles est supposée être constante et ne doit pas être altérée au cours de son exploitation [9]. Ainsi le maintien de la qualité microbiologique des eaux thermales ne peut pas être assuré par la présence d'un désinfectant en concentration résiduelle comme cela est réalisé dans les réseaux de distribution d'eau potable par la chloration. Les principales mesures appliquées, conformément à la réglementation, reposent sur des séquences de nettoyage et de désinfection des réseaux de distribution en dehors des périodes d'utilisation de l'eau par les curistes. Le nettoyage permet l'élimination des dépôts organiques ou inorganiques, susceptibles d'interférer avec les produits de désinfection et d'altérer leur efficacité [5]. La désinfection est principalement réalisée en conditions dynamiques sur l'ensemble du réseau *via* des traitements thermiques ou chimiques basés sur l'utilisation de soude, de chlore ou de peroxyde d'hydrogène [4]. À l'issue de chacune des séquences de nettoyage ou de désinfection, les réseaux de distribution sont rincés avec de l'eau thermale ou de l'eau potable jusqu'à l'élimination complète de toute trace de produits chimiques [4]. Les conditions dynamiques sont caractéristiques des procédures de nettoyage en place (NEP) définies comme le nettoyage et la désinfection d'éléments complets d'un réseau de canalisation par la circulation d'eau et de produits chimiques sans démontage ou

ouverture de ses éléments constitutifs [1]. Les conditions statiques sont utilisées pour des éléments de conception plus complexe pour lesquels le NEP n'est pas adapté [10]. Les pièces amovibles des postes de soins sont ainsi démontées et subissent différentes étapes telles que le nettoyage par immersion et brossage dans des solutions désincrustantes et la désinfection. Chacune de ces étapes est suivie d'un rinçage réalisé en eau potable, si la composition (interférence possible avec les produits utilisés) et la disponibilité de la ressource d'eau thermale ne permettent pas son utilisation. Les traitements sont appliqués en action préventive de façon à limiter tout risque de contamination ou en action curative en réponse à une contamination constatée lors des autocontrôles effectués par l'établissement thermal ou lors des contrôles règlementaires.

Malgré les actions préventives et/ou curatives mises en place pour lutter contre les problèmes de contaminations microbiologiques, des contaminations intermittentes et dispersées sont parfois observées [7] notamment pour *P. aeruginosa* [4]. Cette bactérie est principalement détectée au niveau des points d'usage et l'hypothèse d'une contamination du réseau par les curistes est souvent avancée. Les postes de soins font donc l'objet d'une attention particulière et l'optimisation des procédures de nettoyage et désinfection des parties amovibles des postes de soins implique un ajustement constant des produits et des concentrations à utiliser [7].

Dans ce contexte, ce travail a été réalisé pour proposer un essai permettant de valider l'efficacité d'une procédure de nettoyage et désinfection appliquée spécifiquement aux postes de soin à l'égard de biofilms de *P. aeruginosa*.

Matériel et Méthodes

Souche de *P. aeruginosa*, conditions de culture et développement du biofilm

La souche environnementale ST111, isolée d'un réseau d'eau potable et identifiée parmi un panel de souches comme étant fortement productrice de biofilm [8] a été utilisée pour obtenir un biofilm de 24 h sur différents matériaux. Elle a été mise en culture selon un protocole standardisé. Une cryobille, support de conservation de la souche à - 80°C, a été déposée sur milieu sélectif CN. Un isolement sur gélose non sélective PCA sans glucose a été réalisé avant de préparer une suspension de la souche en milieu liquide Luria Broth (LB) sous agitation à 37°C pendant une nuit. Cette suspension a ensuite été utilisée pour inoculer un milieu minimum favorisant la formation de biofilm. Ce milieu est obtenu en diluant au dixième du milieu M63 10X (20 g (NH₄)₂SO₄, 30 g KH₂PO₄ et 70 g K₂HPO₄ pour 1 L d'eau déminéralisée) avec une eau minérale naturelle embouteillée fortement minéralisée (résidu sec à 180°C : 844 mg/L). Cette dernière a préalablement subi un traitement de 2 h à 60°C pour éliminer sa flore autochtone, sans dégrader son contenu minéral par stérilisation classique à 121°C pendant 15 min. Ce milieu a été supplémenté en acides casamines à 0,5 %, en glucose à 0,2 % et en MgCl₂ à 1 mM [2] afin d'obtenir un milieu M63 modifié M63mF adapté à la formation d'un biofilm en 24 h. L'inoculation du milieu est réalisée de façon à obtenir une DO_{600nm} de 0,1.

Matériaux et conditionnement

Au total 6 matériaux différents ont été utilisés comme support de biofilm. Il s'agissait de cuivre, de laiton (CuZn36), d'acier inoxydable 316 L, de polyéthylène (PE 500), de polychlorure de vinyle surchloré (PVC-C) et d'éthylène-propylène-diène monomère (EPDM). Des coupons de forme rectangulaire (64 mm x 40 mm) de 3 ou 5 mm d'épaisseur, respectivement pour les matériaux métalliques et les matériaux organiques, ont préalablement été conditionnés par immersion totale dans un bain d'éthanol à 70 % pendant 10 min, suivi d'une sonication d'une heure à 60°C dans de l'eau stérile, de deux rinçages successifs de 10 min par immersion totale dans de l'eau déminéralisée stérile à 60°C et enfin par un séchage sous poste de sécurité microbiologique.

Chaque coupon a été placé en position inclinée dans un pot de prélèvement de façon à favoriser la formation d'un biofilm à l'interface air/liquide en présence de 30 mL de milieu M63mFensemencé avec la souche ST111. Le biofilm a été obtenu après une incubation de 24 h à 30°C. La figure 1 présente le protocole mis en place pour évaluer l'efficacité de la séquence de nettoyage et désinfection. Pour chaque matériau, deux coupons témoins ont été utilisés pour quantifier le biofilm avant traitement, deux coupons ont été utilisés pour quantifier le biofilm immédiatement après traitement, et deux coupons ont été utilisés pour évaluer la capacité de régénération du biofilm une semaine après traitement (test de recroissance). Pour cela les coupons sont placés dans du milieu M63mF pendant une semaine à 30°C. Au total 12 coupons de chaque matériau ont été colonisés par le biofilm de ST111, lors de deux essais indépendants réalisés à une semaine d'intervalle.

Séquence de traitement

Les coupons colonisés par un biofilm de 24 h ont tout d'abord été immergés 10 min dans 40 mL de détartrant Strip-A-Way (mélange d'acides phosphorique et nitrique et d'alkyléthoxypropoxyates, Ecolab®, France) dilué à 3 % en eau potable puis rincés 2 fois dans 50 mL d'eau potable pendant 10 min. Les coupons ont ensuite été immergés pendant 1 h dans 40 mL de désinfectant SekuseptAktiv (mélange de percarbonate de sodium, d'acide citrique et de carbonate de sodium, Ecolab®, Suisse), reconstitué à raison de 10 g de produit en poudre dans 1 L d'eau potable, avant d'être rincés deux fois dans 50 mL d'eau potable pendant 10 min. Les coupons rincés ont ensuite été aspergés à l'aide de désinfectant de surface P3-Alcodes (éthanol, Ecolab®, France). Après un temps de contact de 10 min, deux nouveaux rinçages dans 50 mL d'eau potable ont été effectués pendant 10 min (figure 3). L'absence de *P. aeruginosa* dans l'eau potable avait été préalablement validée.

Suivi du biofilm avant et après traitement

L'analyse du biofilm a été réalisée à l'aide de plusieurs techniques. Le marquage au cristal violet a été utilisé comme marqueur global du dépôt organique. La quantification de l'ATP intracellulaire a été utilisée pour mettre en évidence l'activité métabolique du bio-

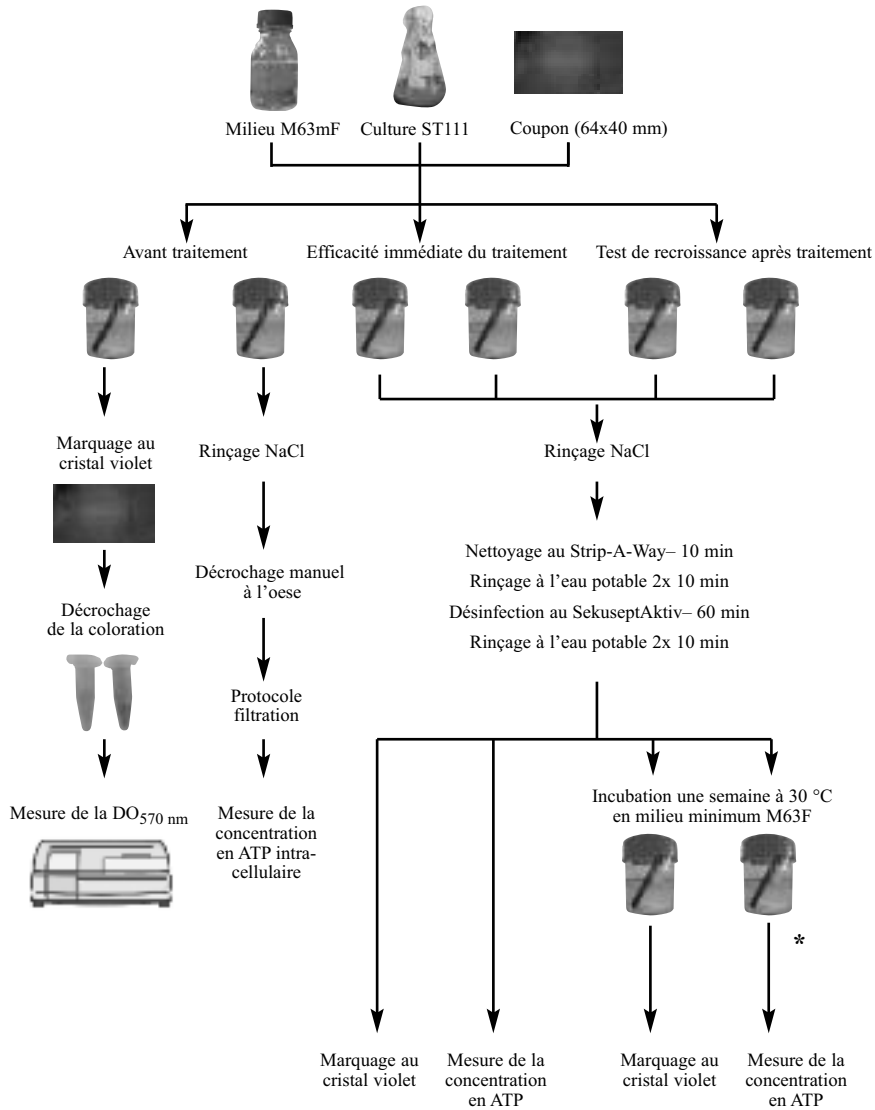


Figure 1 : Protocole d'essai permettant d'évaluer l'efficacité d'une procédure de nettoyage des parties amovibles des postes de soins
 (* : Balayage de spectre sur surnageant de culture permettant la mise en évidence des facteurs de virulence)

film. À l'issue des tests de recroissance, la présence potentielle de *P. aeruginosa* une semaine après traitement a également été recherchée spécifiquement par le dosage de la pyocyanine et de la pyoverdine et/ou par culture sur milieu CN.

Marquage au cristal violet

La quantité de biofilm formé par la souche ST111 sur les différents matériaux et la quantité de biofilm présent à l'issue du test de recroissance ont été évaluées par marquage au cristal violet. Pour cela, 500 µL de cristal violet 1 % (CV) ont été ajoutés dans le milieu de culture au contact d'un coupon de chacun des matériaux. Après 15 min d'incubation à température ambiante, les coupons ont été rincés deux fois par immersion totale dans un bain de PBS 1X pendant 10 min de façon à éliminer la coloration présente en excès. Après rinçage, le biofilm formé à l'interface air/liquide sur les coupons et marqué par le CV a été décroché manuellement à l'aide d'une cèse et le colorant a été dissous dans 1 mL d'éthanol 40 % avant d'être quantifié par mesure de la densité optique à 570 nm (DO_{570nm}).

Mesure de l'activité métabolique globale au sein du biofilm : ATPmètrie

L'activité de la population bactérienne adhéree à la surface des différents matériaux avant traitement, après traitement et à l'issue du test de recroissance a été évaluée par mesure de l'ATP intracellulaire. Pour cela, un coupon par matériau a été immergé dans un pot de prélèvement contenant 40 mL de NaCl 9 ‰. Les cellules adhérees formant le biofilm à l'interface air/liquide ont été décrochées manuellement à l'cèse et remises en suspension. L'ATP intracellulaire a été extrait et mesuré avec le kit QGA™-Quench Gone Aqueous (Aqua-Tools, France).

Mise en évidence spécifique de *P. aeruginosa*

La recherche de *P. aeruginosa* a été réalisée en ensemençant le surnageant de culture du test de recroissance sur gélose CN (AES, France) pendant 48 h à 37°C. La recherche des pigments caractéristiques de *P. aeruginosa* a également été réalisée à partir des surnageants de culture permettant de générer le biofilm de 24 h et les surnageants de culture issus du test de recroissance. Pour cela, ils ont été centrifugés pendant 10 min à 7 000 g puis filtrés sur membrane 0,2 µm. Une analyse de spectre a été effectuée sur chaque surnageant et les valeurs d'absorbance mesurées à 400 nm (DO_{400nm}) et à 691 nm (DO_{691nm}), correspondant respectivement aux longueurs d'ondes d'absorbance maximale de la pyoverdine [6] et de la pyocyanine [3], ont été relevées.

Résultats et discussion

L'efficacité des antiseptiques et désinfectants chimiques commercialisés est attestée par des essais réalisés conformément à des méthodes normalisées. Ces essais reposent sur une mesure de l'efficacité des produits sur des suspensions de micro-organismes en eau distillée, sur des suspensions de micro-organismes en présence de substances interférentes et également sur des surfaces. Ces essais sont calibrés mais ne permettent pas de

représenter l'exhaustivité des applications et les conditions utilisées demeurent éloignées d'un biofilm de réseau d'eau thermale. Par ailleurs il n'existe pas de normes d'essais permettant d'évaluer l'efficacité d'une procédure de nettoyage et désinfection utilisant successivement plusieurs produits, ni de norme d'essais terrain. En conséquence, l'optimisation des séquences de nettoyage et désinfection est réalisée au cas par cas par les exploitants avec toutes les difficultés qui peuvent en découler. Dans ce contexte, nous avons développé une méthodologie permettant de valider en laboratoire l'efficacité d'une séquence de nettoyage et désinfection à l'égard de biofilms de *P. aeruginosa*. Cette méthodologie repose sur l'utilisation d'un modèle de biofilm de *P. aeruginosa* obtenu sur différents matériaux en contact avec un milieu minimum préparé avec une eau minérale naturelle pour se rapprocher des conditions de minéralisation des eaux thermales. Dans cette étude nous avons opté pour une eau minérale naturelle embouteillée présentant un résidu sec à 180°C de 844 mg/L. La mesure de l'ATP intracellulaire a été retenue comme indicateur global de l'activité métabolique du biofilm. La concentration en ATP intracellulaire reflète la croissance du biofilm ou sa capacité à se régénérer après traitement.

Le temps moyen entre chaque traitement dans les réseaux d'eau thermale n'excédant pas 24 h, l'activité métabolique et la substance organique liées à la présence d'un biofilm de *P. aeruginosa* ou l'effet de la séquence de nettoyage et de désinfection ont donc été évaluées sur des matériaux mis en contact 24 h avec les bactéries.

Ainsi, au bout de 24 h d'exposition aux bactéries, les valeurs d'activité métaboliques sont variables en fonction de la nature des matériaux [1 156 e - 26 959] pg d'ATP/cm² pour les matériaux métalliques et [17 756 - 128 133] pg d'ATP/cm² pour les matériaux organiques. L'activité métabolique la plus faible (< 6 500 pg d'ATP/cm²) a été mesurée pour le cuivre et le laiton tandis que la plus élevée (> 100 000 pg d'ATP/cm²) a été mesurée pour l'EPDM (Figure 2, barres gris sombre). Ces premiers résultats montrent que la biomasse bactérienne métaboliquement active ancrée sur le matériau est dépendante de la nature du matériau constituant le réseau. Cette remarque est également valable pour le dépôt organique (Figure 3, barres gris sombre) avec un dépôt maximal pour l'EPDM et minimal pour l'inox.

L'évaluation de la séquence de traitement telle qu'elle est appliquée ici immédiatement après son application montre une extinction de l'activité métabolique quelle que soit la nature du matériau (Figure 2, barres gris intermédiaire) alors que le dépôt organique n'est pas éliminé (Figure 2, barres gris intermédiaire). Par contre cette activité recroît une semaine après le traitement (Figure 2, barres gris clair) à des valeurs toujours inférieures aux activités avant traitement et ce pour tous les matériaux. L'analyse de la biomasse bactérienne qui a repoussé montre une absence de *P. aeruginosa* sur milieu sélectif, confirmée par l'absence de production de deux facteurs de virulence de cette espèce, la pyoverdine et la pyocyanine. Cette activité métabolique de repousse sur les matériaux testés provient donc probablement de la flore autochtone de l'eau potable utilisée pour les rinçages. Il n'en demeure pas moins que si l'activité métabolique liée à *P. aeruginosa* est effectivement affectée par la séquence de traitement, il reste potentiellement un dépôt organique sur tous les matériaux qui peut s'avérer être un catalyseur pour la formation de biofilms suivants.

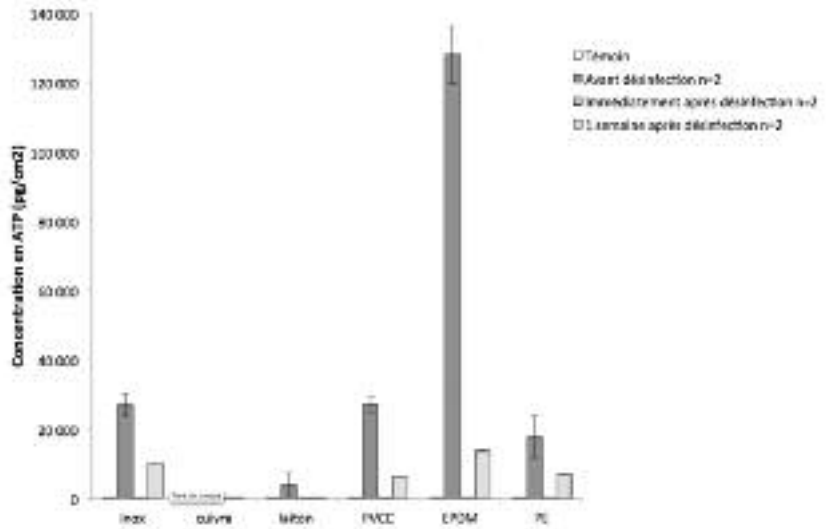


Figure 2 : Appréciation de l'activité métabolique du biofilm : mesure de l'ATP intracellulaire (pg/cm²)

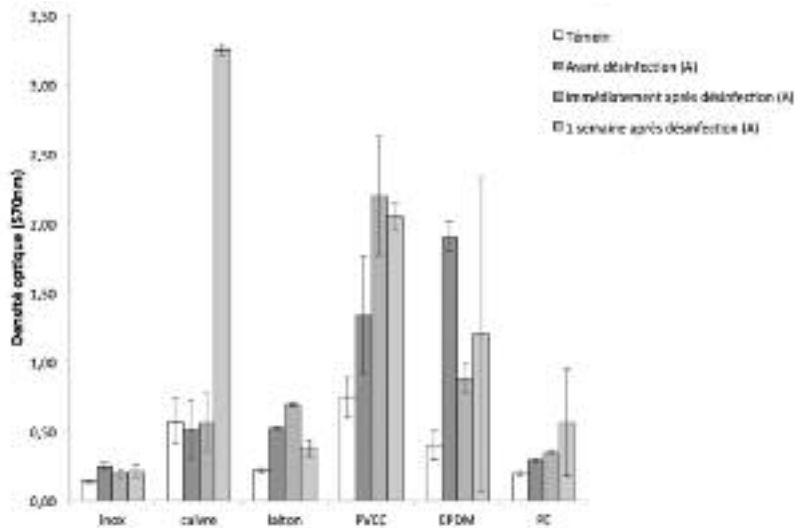


Figure 3 : Appréciation du dépôt organique présent sur différents matériaux par marquage au cristal violet

Conclusion

Il apparaît de cette étude que cette méthodologie pourrait permettre à chaque station thermale d'envisager régulièrement, à moindre coût, une évaluation de la séquence de traitement appropriée à la nature des matériaux de son réseau et à la qualité de son eau (minéralité).

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'un co-financement CSTB/Ville d'Enghien-Les-Bains.

Thèse en Génie des procédés, spécialité microbiologie/environnement.

Références

1. Bremer P.J., Fillery S., McQuillan A.J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology* 2006,106:254-262.
2. Caiazza N.C. et al. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 2007;189,9:3603-3612.
3. Das T., Manefield M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2012,7(10).
4. Direction Générale de la Santé. *La qualité microbiologique des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques en milieu thermal au cours de la saison thermale 2001*. 2005,22 p.
5. McDonnell G., Russell A.D. Antiseptic and disinfectants : activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999;12,1:147-179.
6. Meyer J.M., Abdallah M.A. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* : biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology* 1978,107:319-328.
7. Morin, J.-P., Graber-Duvernay B. Surveillance des *Pseudomonas* et expérience de désinfection aux thermes nationaux d'Aix-les-Bains. *Press Therm Climat* 2002,139:41-51.
8. Pessereau C. et al. *Influence of water mineralisation on Pseudomonas aeruginosa biofilm development* : World Water Congress & Exhibition, Lisbon Congress centre, 21 – 26 September 2014, Lisbon.
9. Petraccia L. et al. Water, mineral waters and health. *Clinical nutrition* 2006,25:377-385.
10. Timperley D.A. Cleaning in place (CIP) *Journal of the Society of Dairy Technology* 1989;42,2:32-33.