

Aptitude des matériaux à favoriser le développement de biofilm. Méthode d'essais

■ L. MOULIN¹

1. Introduction

Les matériaux en contact avec l'eau potable peuvent relarguer des composés amenant à la dégradation de la qualité de l'eau. Pour limiter ces effets, la directive 98/83/EC du 3 novembre 1998 impose aux États membres la mise en place de mesures préventives. Pour cela une standardisation des méthodes d'essais est nécessaire. La détermination de l'influence des matériaux à la croissance bactérienne est l'un des critères retenus pour l'évaluation des matériaux au niveau européen (EAS).

En effet, le développement des bactéries dans les réseaux de distribution d'eau est une véritable problématique de santé publique. Cette croissance se fait principalement au sein d'une structure biologique complexe appelée biofilm. Ce développement peut entraîner des modifications de la qualité de l'eau distribuée, par exemple en modifiant ses caractéristiques gustatives. Mais il joue également un rôle protecteur vis-à-vis de la flore autochtone et facilite donc l'émergence de micro-organismes pathogènes tels que des amibes, les *Pseudomonas*, les légionelles, etc.

Ce développement de bactéries au sein des canalisations est probablement influencé par la nature et les caractéristiques des matériaux qui les composent (surface rugueuse ou lisse, quantité de matière carbonée relarguée, métaux, etc.).

En vue de l'élaboration d'une réglementation européenne harmonisée (EAS), un groupe de travail européen s'est proposé de définir une méthode normalisée de mesure de l'aptitude des matériaux en contact

avec l'eau potable à promouvoir la prolifération microbienne. Ce test est basé sur les travaux hollandais de l'équipe de D. VAN DER KOOIJ [1]. Il est basé sur une méthode dite BPP, pour *Biomass Production Potential*. Cette mesure, simple, permettra de classer les matériaux en fonction de leur aptitude à promouvoir le développement du biofilm.

Lors de cette étude le protocole a été adapté afin de faciliter sa mise en œuvre et d'en limiter la variabilité.

Nous nous proposons ici, après un bref rappel sur le biofilm, de présenter les résultats des essais interlaboratoires et les conclusions du groupe de travail.

2. Le biofilm

Si pendant longtemps, la microbiologie s'est intéressée aux populations bactériennes pures en milieu liquide, au cours des années 1990 et 2000 l'attention des chercheurs s'est concentrée sur les populations microbiennes attachées aux surfaces. Les communautés bactériennes vivant au sein de ces structures complexes extracellulaires, appelées biofilms (*figure 1*), ont alors été plus spécifiquement observées. Ce mode de développement est retrouvé dans quasiment tous les écosystèmes [2]. Les bactéries qui composent le biofilm ont des caractéristiques physiologiques et morphologiques distinctes de celles des formes planctoniques. De nombreuses publications utilisant les puces à ADN ont montré que les profils d'expression des bactéries étaient différents entre ces deux états [3, 4, 5]. Il apparaît que seuls certains gènes spécifiques du génome sont exprimés dans le cas d'un biofilm. Des avancées importantes ont alors été faites sur certains aspects de la physiologie bactérienne, comme le « corum sensing » ou les transferts d'information génétique.

¹ CRECEP - 156, avenue P.V. Couturier - 75014 Paris.

L'étude des bactéries dans ces conditions spécifiques doit permettre de mieux comprendre leur physiologie dans l'environnement mais également le rôle de certains gènes aux fonctions inconnues (pour revue, voir [6] ou [7]).

2.1. Formation

En fonction de la surface du matériau, de la population (simple ou multi-espèces) ou des nutriments disponibles, le biofilm se développera différemment. Les étapes de la formation des biofilms ont principalement été étudiées pour des espèces uniques telles que *E. Coli*, *V. Cholerae*, ou autre. Il est à noter que la plupart des études publiées sont faites sur des surfaces « simples » comme le verre ou l'acier inoxydable.

Les étapes de développement d'un biofilm sont les suivantes.

- ➊ Déplacement des bactéries au sein du milieu liquide, soit via les courants, soit via la sédimentation, soit par mobilité intrinsèque de la bactérie (flagelles, pili de type I...).
- ➋ La formation d'une couche de quelques individus sur le support. Ces individus vont alors modifier leur expression génétique. Par exemple chez *Pseudomonas*, on assiste à une augmentation de l'expression des gènes *algC*, diminution de l'expression de *fliC*, synthèse des pili de type IV mais également, synthèse de LPS, expression de molécules spécifiques à la paroi, etc.
- ➌ Cette expression aboutit à l'agrégation des individus et à la formation de microcolonies à la surface du matériau. Chez *Pseudomonas*, un signal semble être initié par la protéine *Crc* et provoque la disparition du flagelle. Les cellules commencent alors à synthétiser des molécules de « signalisation » (appelées « *corrum sensing* » ou QS) qui semblent jouer un rôle essentiel dans l'établissement du biofilm.
- ➍ La synthèse de molécules structurales est alors initiée, par exemple l'alginate pour les *Pseudomonas* ou l'acide colanique (EPS) pour *E. Coli*. Cette structure va entourer les bactéries et prendra une forme liée aux conditions environnementales (flux, débit...).

2.2. Dangers

Un biofilm se forme progressivement sur toute surface en contact avec l'eau, quel que soit le matériau. Mais certains matériaux peuvent favoriser le dévelop-

pement de ce biofilm par l'apport d'éléments nutritifs et/ou par des paramètres physiques favorables à l'accrochage du biofilm (rugosité...)

Ce biofilm est source d'un fort développement bactérien et les densités microbiennes retrouvées sur les parois des matériaux utilisés dans la distribution de l'eau peuvent atteindre jusqu'à 10^8 UFC/cm². Parmi les micro-organismes identifiés certains peuvent porter atteinte à la santé du consommateur (légionelles, *Pseudomonas Aeruginosa*...). Cette structure biologique consomme également les biocides rémanents utilisés (chlore, produits de désinfection...) limitant ainsi leur efficacité.

3. Méthodes de mesures et programme de l'étude

Toutes ces études, notamment les observations de microscopie confocale, ont montré l'hétérogénéité des biofilms sur les supports. Il est donc important de définir un test général permettant d'appréhender le développement d'un biofilm sur un matériau.

Dans la littérature scientifique, il existe de nombreuses méthodes pour mesurer les biofilms ou appréhender leur nature (microscopie...). Mais d'une part, la notion de quantité n'est pas souvent abordée et d'autre part, les méthodes ne sont pas applicables facilement pour les matériaux en contact avec l'eau potable. C'est pourquoi, il fallait une méthode simple, normalisable, reproductible et robuste, applicable aux matériaux. Des critères d'acceptabilité devront également être développés pour écarter les matériaux susceptibles de conduire à des développements jugés excessifs du biofilm.

Des évaluations de ce type, mais basées sur des approches sensiblement différentes sont réalisées pour l'évaluation des matériaux en contact avec l'eau, notamment en Grande-Bretagne et en Allemagne, par exemple l'estimation du volume du biofilm, la mesure de la consommation d'oxygène.

3.1. BPP (biomass potential production)

Au cours de cette étude, le test BPP (biomass potential production) a été utilisé afin de mesurer le potentiel de différents matériaux à promouvoir le développement bactérien. Ces essais se sont déroulés dans différents laboratoires européens fortement impliqués

dans le contrôle de l'eau. Cette étude, conduite par le KiWA, est basée sur une caractéristique commune à tous les organismes vivants : la présence dans la cellule d'une molécule « énergétique », l'ATP. La mesure de la quantité d'ATP reflètera donc la quantité de matière organique d'origine biologique.

Pour mesurer l'ATP, on utilise une réaction dont le rendement est directement corrélé à la présence d'ATP dans l'échantillon. La réaction est la suivante :

$$\text{ATP} + \text{luciférine} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{oxyluciférine} + \text{PP} + \text{ADP} + \text{CO}_2 + \text{lumière}$$

Cette réaction est catalysée par la luciférase, une enzyme produite par le gène *luxA* des lucioles. Cette réaction ne peut se faire qu'en présence d'ATP, les autres éléments étant introduits ou présents en excès. L'efficacité de la réaction est donc directement liée à la quantité d'ATP et la lumière émise est directement proportionnelle à la quantité de matière vivante. La lumière est mesurée en unité arbitraire dite RLU pour *Relative Luminescence Unit*.

Cette méthode est très largement utilisée en recherche ou dans l'industrie pour vérifier la présence de bactéries ou d'organismes vivants.

3.2. Programme d'étude

Au cours de ces études (2^e phase d'une étude initiée en 2002), différents points ont été abordés :

- mise en place d'une méthode de calibration (rapport ATP-RLU) au sein des différents laboratoires,
- mise au point et comparaison des méthodes de décrochement du biofilm,
- application du test BPP et dispersion des mesures.

Afin de caractériser l'aptitude de chaque matériau à favoriser le développement d'un biofilm – à cause de la libération de molécules assimilables, de la surface, etc. – il est mis en contact avec une eau de distribution déchlorée pendant 4 mois. Des analyses sont effectuées au cours des 2^e, 3^e et 4^e mois. Ces analyses portent sur une mesure de la biomasse fixée et de la biomasse libre. Afin de ne pas limiter le développement du biofilm en raison d'un manque d'oxygène, l'eau est changée toutes les semaines.

3.3. Protocole de test

- Mise en contact de l'échantillon avec 900 ml d'eau potable du réseau, supplémentée en phosphate et dé-

pourvue de chlore pour permettre la croissance bactérienne.

- Inoculation d'eau brute de rivière permettant un ensemencement bactérien lors de la première mise en eau.
- Changement de cette eau toutes les semaines, pour permettre une concentration en oxygène constante.
- Après 56, 84 et 112 jours une analyse est réalisée :
 - pour cela, deux échantillons de 50 cm² sont prélevés et 300 ml d'eau sont récupérés,
 - le biofilm est « décroché » des matériaux par sonication (cf 3.4).

3.4. Décrochement du biofilm

Pour étudier l'influence des procédés de récupération du biofilm, différentes méthodes ont été testées :

- décrochement par sonication à basse énergie (3 fois 2 minutes, bain à ultrason),
- par sonication à haute énergie (sonosonde),
- par « swabbing » (grattage avec un coton tige).

Les résultats sont présentés *figure 1*.

La méthode manuelle, par grattage, donne la plus grande quantité de biofilm, mesuré par ATPmétrie ; elle est donc utilisée comme référence pour comparer les autres méthodes. L'extraction par sonication à haute énergie permet de récupérer 100 % du biofilm. Alternativement, l'utilisation d'un bain à ultrasons avec un rapport énergie/volume élevé permet également cette récupération. Toutefois il convient de répéter l'extraction trois fois pour récupérer plus de 90 % de la biomasse.

3.5. Calibration

Afin d'exprimer les résultats en ATP et non en unités de luminescence, une courbe de calibration, utilisant des ajouts dosés d'ATP, est nécessaire. Les laboratoires ont démontré que l'utilisation d'une courbe de calibration « moyenne » provenant d'au moins 8 mesures permet de limiter la variabilité des résultats. Différentes solutions ont ensuite été distribuées aux laboratoires afin de vérifier la précision de nos mesures (*tableau I*).

La variabilité peut être réduite en utilisant la courbe de calibration moyenne résultant d'au moins huit mesures différentes. Cette méthode d'analyse a été retenue pour les tests matériaux.

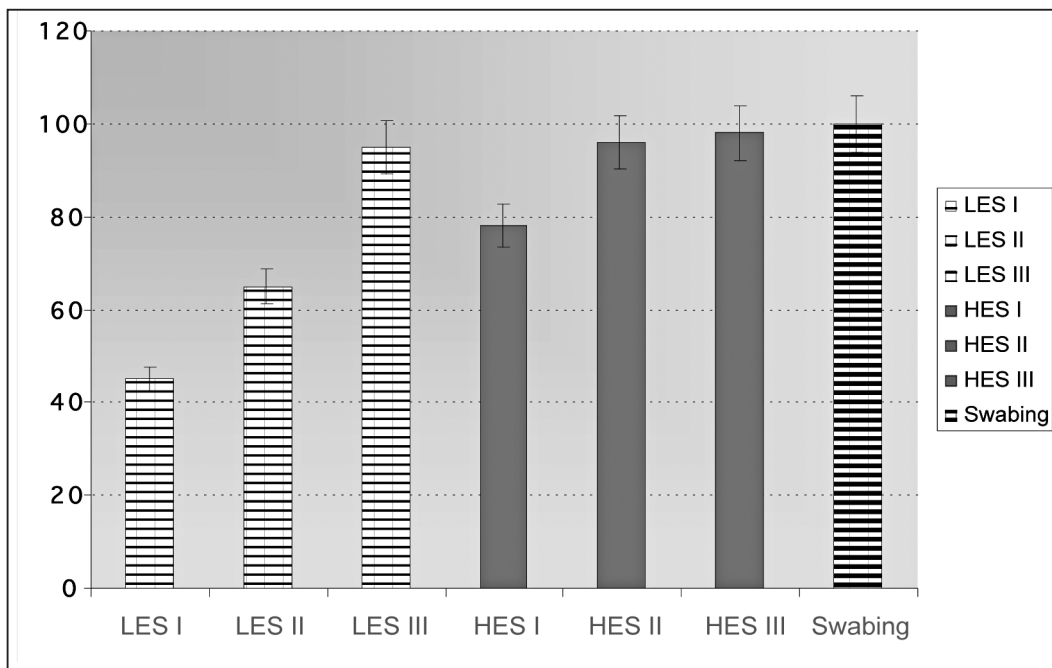


Figure 1. Sonication basse énergie (LES, 47W/L) ou haute énergie (HES, 45 %) sans remplacement d'eau entre les extractions. I, II ou III symbolise le nombre de répétition

3.6. Résultats matériaux et dispersion

Différents matériaux ont alors été mis en eau, en suivant les principes définis précédemment. Les résultats

sont exprimés en BPP, c'est-à-dire la somme de la biomasse planctonique et de la biomasse attachée. Les résultats des mesures sont présentés sur les *tableaux II et III*, ainsi qu'en *figure 2*.

Échantillon	Gamme de concentration (ng ATP/l)	Covariance (%)					
		Calibration individuelle			Calibration moyenne		
		#1	#2	#3	#1	#2	#3
Eau de distribution autoclave avec ATP	10	22	19	22	14	4	9
	100	4	14	18	7	37	9
	± 100	6	-	19	5	-	11
	± 1 000	4	17	18	7	44	11
Biomasse décrochée	250 - 3 000	14	-	26	14	-	12
		14	-	30	7	-	12
		32	-	38	28	-	18
		24	-	38	23	-	20
		-	-	38	-	-	19
Eau de distribution autoclave avec ATP et Ca	200	6	-	17	5	-	10
Biomasse décrochée avec Ca	200 - 1 000	4	-	15	6	-	9
		23	-	14	15	-	7
		22	-	-	19	-	-
COV (%)		14	-	22	11	-	12

Tableau I. Covariance des résultats lors de trois séries de mesures entre les cinq laboratoires

Matériau	Biomass Production Potential (BPP) (en pg ATP/cm ²)							
	P#1*	P#2	P#3	P#4	P#5	AVG	STD	COV (%)
blanc	< 1	18,2	24,8	35,7	3,6	17,2	13,8	80
verre	133	36,2	55,2	50,5	9,7	56,9	46,2	81
Inox	290	57,2	192,9	170,7	43,2	151	102	67
PVC-C	346	44,7	109,3	167,8	18,4	137	130	94
PE-Xc	329	126	230,7	226	118	206	87	42
PE 100	3 045	743	1 598	1 817	1 538	1 746	827	47,4
EPDM	46 021	26 278	33 059	20 198	40 671	33 245	10 454	31,5
PVC-P	46 469	18 100	48 990	21 201	23 554	31 663	14 820	46,8

*Test avec un rapport S/V de 0,33 cm⁻¹

Tableau II. Résultats de production de biomasse sur différents matériaux. Ces matériaux ne sont pas forcément représentatifs du type de revêtement utilisé

Matériau	Valeur moyenne (%)					Valeur moyenne ± écart-type
	P#1*	P#2	P#3	P#4	P#5	
Verre	46	43	59	17	81	54,2 ± 25,1
Inox	62	70	85	34	95	71,8 ± 23,2
PVC-C	64	63	81	35	93	71 ± 22,8
PE-Xc	33	76	82	48	92	71,2 ± 17,9
PE 100	93	87	91	74	86	86,8 ± 8,2
EPDM	91	95	95	92	97	93,8 ± 2,8
PVC-P	84	93	88	88	93	89 ± 4,2

*Test avec un rapport S/V de 0,33 cm⁻¹

Tableau III. Contribution de la biomasse attachée à la valeur globale de la biomasse

4. Conclusions

Les essais ont été réalisés sur différents matériaux commercialement disponibles et couramment utilisés en contact de l'eau. Après s'être assuré que les conditions étaient optimales (eau de test sans effet sur la croissance bactérienne, courbe de calibration...), nous avons immergé les échantillons à 30°C pendant 54, 84 et 112 jours.

Après séparation de la biomasse de son support, celle-ci est quantifiée par ATPmétrie (mesure de la quantité d'ATP via une réaction lumineuse).

Le test prend en compte la biomasse fixée et la biomasse libre dans l'eau d'essai afin de calculer un indice global, BPP, exprimé en pg ATP/cm².

Nos résultats montrent que l'on peut définir ici trois types de matériaux :

1/ ceux qui ne promeuvent pas ou très peu la croissance bactérienne,

2/ ceux qui sont faiblement promoteurs,

3/ ceux qui sont fortement promoteurs.

Le test BPP permet donc bien de classer les matériaux suivant leurs aptitudes à promouvoir la croissance bactérienne. Ce test est simple à mettre en œuvre et applicable à tout type de matériau. Les résultats sont homogènes entre les laboratoires et les classements effectués entre les matériaux identiques.

Les conclusions du rapport sur la standardisation de mesure de la biomasse [8] remis à la Commission européenne en juin 2006 sont les suivantes.

❶ La variabilité peut être diminuée en multipliant les courbes de calibration et en standardisant la méthode. Les covariances obtenues entre les laboratoires sont inférieures à 15 % pour les solutions calibrées et entre 15 et 25 % pour les tests de biomasse.

② Les méthodes de décrochement de la biomasse avant la mesure sont différentes entre les laboratoires et pourraient être standardisées afin de limiter les divergences, mais tout choix de méthode avec un décrochement supérieur à 90 % (vs. Swabbing) est acceptable.

③ Les tests interlaboratoires sur les matériaux montrent que le test est valide. Tous les laboratoires ont des biomasses observées supérieures au contrôle (avec une covariance de l'ordre de 40 % entre les laboratoires).

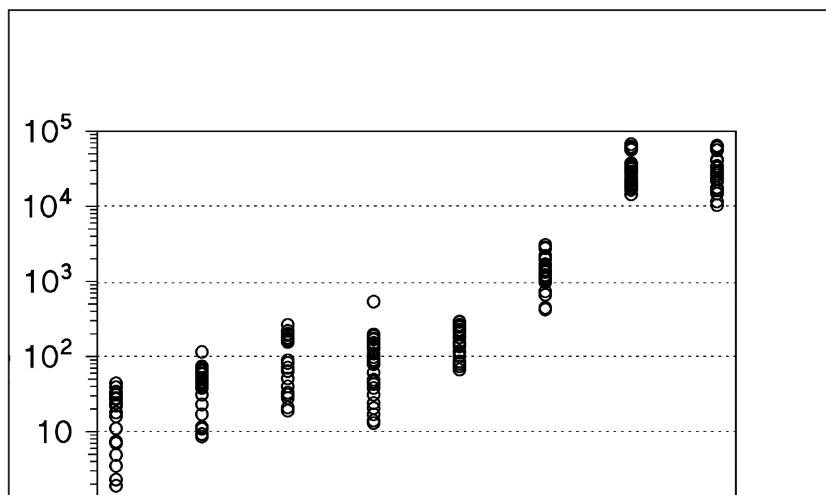


Figure 2. Résultats de production de biomasse sur différents matériaux. Ces matériaux ne sont pas forcément représentatifs du type de revêtement utilisé

Bibliographie

- [1] VAN DER KOOIJ D., VROUWENVELDER J.S., VEENENDAAL H.R. : "Elucidation and control of biofilm formation processes in water treatment and distribution using the Unified Biofilm Approach". *Water Sci Technol.* 2003 ; 47 (5) : 83-90.
- [2] STOODLEY P., SAUER K., DAVIES D.G., COSTERTON J.W. (2002) : "Biofilms as complex differentiated communities". *Annu. Rev. Microbiol.*, 56 : 187-209.
- [3] SAUER K. (2003) : "The genomics and proteomics of biofilm formation". *Genome Biol.*, 4 : 219.
- [4] SCHEMBRI M.A., KJAERGAARD K., KLEMM P. (2003) : "Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms". *Mol. Microbiol.*, 48 : 253-267.
- [5] WHITELEY M., BANGERA M.G., BUMGARNER R.E., PARSEK M.R., TEITZEL G.M., LORY S., GREENBERG E.P.

- (2001) : "Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms". *Nature*, 413 : 860-864.
- [6] DAVEY M.E., O'TOOLE G.A. (2000) : "Microbial Biofilms : From Ecology to molecular Genetics". *Micro. And Mol. Biol. Reviews* Dec 2000, p 847-867
- [7] TOUSSAINT A., GHIGO J.-M., SALMOND G.P. : "A new evaluation of our life-support system". *EMBO Rep.* 2003 Sep ; 4 (9) : 820-824.
- [8] VAN DER KOOIJ D., BAGGELAAR P.K., VEENENDALL H.R., MOULIN L., CORFITZEN C.B., ALBRECHTSEN H.J., HOLT D., HAMBSCH B. : "Standardising the Biomass Production Potential method for determining the enhancement of microbial growth by construction products in contact with drinking water" *Interlaboratory testing* UE.

Résumé

L. MOULIN. Aptitudes des matériaux à favoriser le développement de biofilms. Méthode d'essais

Les matériaux en contact avec l'eau potable peuvent relarguer des composés amenant à la dégradation de la qualité de l'eau. Pour limiter ces effets, la directive 98/83/EC du 3 novembre 1998 impose aux États membres la mise en place de mesures préventives. Pour cela une standardisation des méthodes d'essais est nécessaire. La détermination de l'influence des matériaux à la croissance bactérienne est l'un des critères retenus pour l'évaluation des matériaux au niveau européen (EAS).

En effet, le développement des bactéries dans les réseaux de distribution d'eau est une véritable problématique de santé publique. Cette croissance se fait principalement au sein d'une structure biologique complexe appelée biofilm. Ce développement peut entraîner des modifications de la qualité de l'eau distribuée, par exemple en modifiant ses caractéristiques gustatives. Mais il joue également un rôle protecteur vis à vis de la flore autochtone et faci-

lite donc l'émergence de micro-organismes pathogènes tels que des amibes, les *Pseudomonas*, les légionelles, etc.

Ce développement de bactéries au sein des canalisations est probablement influencé par la nature et les caractéristiques des matériaux qui les composent (surface rugueuse ou lisse, quantité de matière carbonée relarguée, métaux, etc.).

En vue de l'élaboration d'une réglementation européenne harmonisée (EAS), un groupe de travail européen s'est proposé de définir une méthode normalisée de mesure de l'aptitude des matériaux en contact avec l'eau potable à promouvoir la prolifération microbienne. Ce test est basé sur les travaux hollandais de l'équipe de D. VAN DER KOOIJ [1]. Il est basé sur une méthode dite BPP, pour Biomass Production Potential. Cette mesure, simple, permettra de classer les matériaux en fonction de leur aptitude à promouvoir le développement du biofilm.

Lors de cette étude le protocole a été adapté afin de faciliter sa mise en œuvre et d'en limiter la variabilité.