

Bioadhésion bactérienne dans les réseaux d'eau potable : effets des matériaux et des facteurs environnementaux

■ N. BOUTALEB^{1,2}, H. LATRACHE², O. SIRE¹

Mots-clés : biofilms, eau potable, bioadhésion, polysaccharides membranaires

Introduction

Comme n'importe quel environnement humide, les réseaux de distribution d'eau potable peuvent être colonisés par des biofilms. Ces communautés microbiennes se développent initialement par simple adhésion au support, puis croissent par le jeu d'interactions bactérie-bactérie pour finalement sécréter massivement des exoproduits, essentiellement des polysaccharides [BUSSCHER *et al.*, 1995], pour se protéger des agressions physiques (cisaillement) et chimiques (désinfectants, antibiotiques). Agir durant les phases précoces de formation du biofilm constitue une stratégie de choix pour lutter contre cette nuisance. Nous avons donc caractérisé les interactions bactérie-matériau qui sont responsables de l'adhésion microbienne dans des conditions physico-chimiques très proches de celles qui règnent dans les réseaux de distribution d'eau potable au Maroc. Quatre types de matériaux plastiques commercialisés au Maroc ont servi pour la réalisation de cette étude : le polypropylène (PPR), le polyéthylène réticulé (PEX), le polyéthylène haute densité (PEHD) et le polychlorure de vinyle (PVC).

1. Modèle prédictif de la bioadhésion

Une première partie de notre étude concerne la comparaison du pouvoir d'adhésion (par épifluorescence et imagerie MEB) de deux bactéries modèles (*E. coli* et *P. Aeruginosa*) sur différents matériaux utilisés pour

l'adduction d'eau potable au Maroc. Ces mesures sont confrontées à l'approche théorique DLVO développée par VAN OSS pour mettre en évidence l'importance relative des interactions physico-chimiques dans le processus de bioadhésion [VAN OSS *et al.*, 1986]. En effet ce modèle repose sur le paradigme que les interactions primordiales dans les phases précoces de l'adhésion sont les interactions de van der Waals, acides-bases et électrostatiques. Ce modèle peut être simplifié si l'on considère que les interactions électrostatiques sont très généralement répulsives en raison du caractère anionique que présentent les bactéries et les supports de colonisation quand on se trouve proche de la neutralité (pH \approx 7). Considérant donc les interactions de van der Waals (LW) et acides-bases (AB), l'énergie totale d'adhésion ΔG^{TOTAL} peut être calculée pour un couple bactérie-matériau dans un milieu de suspension donnée :

$$\Delta G^{\text{Total}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}}$$

La *figure 1* présente les corrélations observées entre l'énergie totale d'adhésion et la densité cellulaire de colonisation après 2 heures dans un milieu synthétique en présence de 5 mM NaCl pour les deux souches modèles et les quatre matériaux polymères. Le verre a été également étudié comme matériau de référence. On notera le facteur 10 pour les abscisses entre les deux souches.

Les résultats concernant *E. coli* indiquent clairement une forte corrélation entre le ΔG^{TOTAL} et l'adhésion : une relation linéaire est observée entre ces deux paramètres. Il est donc possible de conclure, pour cette souche, que les interactions physico-chimiques non spécifiques jouent effectivement un rôle primordial dans l'initiation de la bioadhésion. Pour ce qui est de

¹ L2PIC-DSI - Campus de Tohannic - BP 573 - 56017. France.

² LVSPA Faculté des Sciences et Techniques BENI Mellal Maroc.

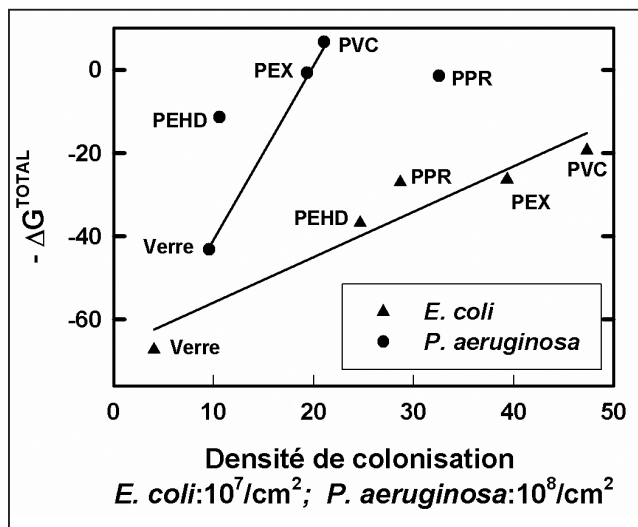


Figure 1. Prédications d'adhésion à l'aide de l'approche DLVO

P. Aeruginosa, une corrélation satisfaisante est observée pour le verre, le PEX et le PVC. On remarque toutefois que les tests d'adhésion sur le PEHD et le PPR s'écartent notablement de la relation simple qui est vérifiée pour les autres matériaux. *P. Aeruginosa*, contrairement à *E. Coli*, est une souche mucoïde sécrétant massivement des polysaccharides. Il est très vraisemblable que ces biopolymères jouent un rôle important dans le phénomène d'adhésion. On voit donc ici qu'il n'est pas possible de conclure de façon générale sur la validité du modèle développé par VAN OSS mais que celui-ci est néanmoins très utile pour sélectionner des matériaux peu propices à la colonisation bactérienne.

2. Effet de la force ionique

L'hydrophobicité des cellules bactériennes a été estimée avec la technique d'adhésion aux hydrocarbures (MATH) qui consiste à évaluer le pourcentage de cellules ayant eu une affinité pour les solvants apolaires hexane et hexadécane. Si ce pourcentage est supérieur à 50 %, les souches sont considérées hydrophobes, dans le cas contraire elles sont jugées hydrophiles. La figure 2 montre l'évolution du caractère hydrophobe de *P. Aeruginosa* et *E. Coli* en fonction de la force ionique. Les histogrammes hachurés représentent l'hexane et les unis, l'hexadécane.

P. Aeruginosa (à gauche) exprime un caractère hydrophile aux trois concentrations salines, ce caractère diminuant considérablement lorsque la force ionique croît de 5 à 75 mM NaCl. *E. coli* (à droite) présente un caractère hydrophile encore plus marqué que *P. aeruginosa*, et qui paraît moins sensible à la force ionique. Il a été démontré qu'une bactérie en suspension aqueuse et à pH neutre se trouve au-dessus de son point isoélectrique ; elle porte donc dans ces conditions une charge globale négative. Il a été également prouvé que l'adhésion aux hydrocarbures (MATH) reflète de manière complexe les interactions électrostatiques de van der Waals [VAN DER MEI *et al.*, 1993]. L'hydrocarbure en suspension présente un caractère hydrophobe et une charge négative [MEDRZYCKA, 1991 ; GEETSEMA-DOORNBUSCH *et al.*, 1993 ; BUSSCHER *et al.*, 1995]. Les interactions électrostatiques répulsives peuvent donc empêcher

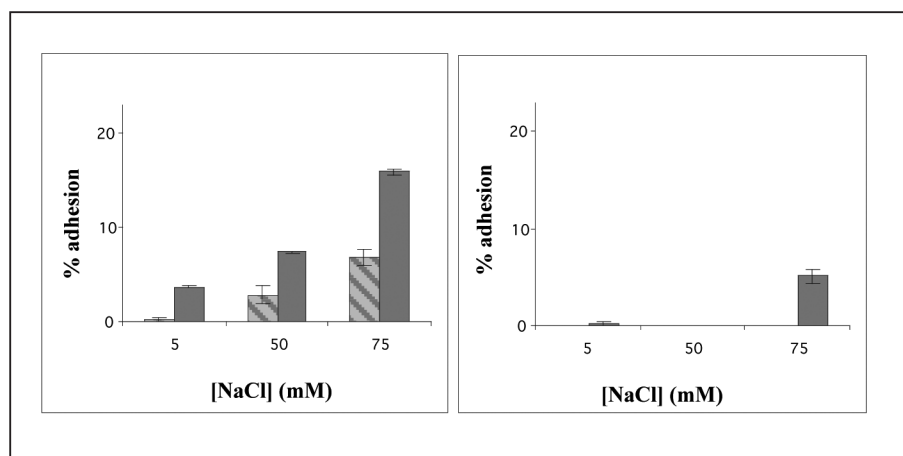


Figure 2. Effet de la concentration saline sur l'hydrophobicité bactérienne (à gauche : *P. Aeruginosa*)

l'adhésion aux solvants organiques hexane et hexadécane [BUSSCHER *et al.*, 1995 ; VAN DER MEI *et al.*, 1995]. Par conséquent, seules les souches présentant une charge négative faible développeront des interactions hydrophobes importantes avec les solvants organiques, hexane et hexadécane [BUSSCHER *et al.*, 2000]. L'augmentation de la force ionique induit une diminution de la charge électrostatique [VAN DER WAL *et al.*, 1997 ; HAMADI *et al.*, 2004]. Cette diminution est attribuée à l'adsorption importante des cations, ce qui provoque la neutralisation des groupes chargés présents à la surface. Par conséquent, l'augmentation de la force ionique supprime les interactions électrostatiques répulsives, ce qui rend compte des effets observés.

La différence d'hydrophobicité entre les deux bactéries peut être due à la différence de leur composition élémentaire (notamment les rapports N/C et O/C) ; en effet, l'hydrophobicité peut augmenter avec le taux de protéines membranaires présentes à la surface de la bactérie et diminuer par la présence de polysaccharides.

3. Effet du pH

L'influence du pH sur l'hydrophobicité des deux bactéries modèles a été recherchée dans une gamme de pH qui correspond aux tolérances des normes [SNIMA NM 03.7.001 ; RODIER, 1996]. La figure 3 présente l'hydrophobicité de *P. Aeruginosa* (à gauche) et de *E. Coli* (à droite) pour trois valeurs de pH (5 mM de NaCl).

Dans l'intervalle de pH compris entre 6,5 et 9,5, *P. Aeruginosa* exprime un caractère hydrophile qui est minimum autour de la neutralité. En accord avec les résultats précédents, *E. Coli* se caractérise par son caractère fortement hydrophile qui, à l'instar de l'effet des sels, est également peu sensible aux variations de pH. À pH acide, la bactérie est en général chargée positivement, les charges négatives de surface apparaissant progressivement au fur et à mesure que le pH s'élève. Ceci peut expliquer l'évolution du caractère hydrophobe de la bactérie. En effet, à pH acide il y a d'avantage de charges positives à la surface de la bactérie ce qui favorise les interactions électrostatiques attractives entre la bactérie et le solvant apolaire. Avec l'augmentation du pH, ces charges positives commencent à diminuer ce qui fait diminuer l'affinité pour les solvants apolaires. En remontant d'avantage le pH, les interactions électrostatiques répulsives deviennent plus importantes ce qui peut expliquer l'augmentation de caractère hydrophobe à pH basique (9,5).

4. Effet du chlore actif

Le chlore est couramment utilisé comme désinfectant ; on considère en général qu'une concentration de 0,3 mg/l est suffisante pour obtenir un effet bactéricide, la concentration de 5 mg/l étant la concentration maximale autorisée par la norme européenne pour la qualité de l'eau potable. Si donc le traitement par le chlore vise essentiellement la population bactérienne

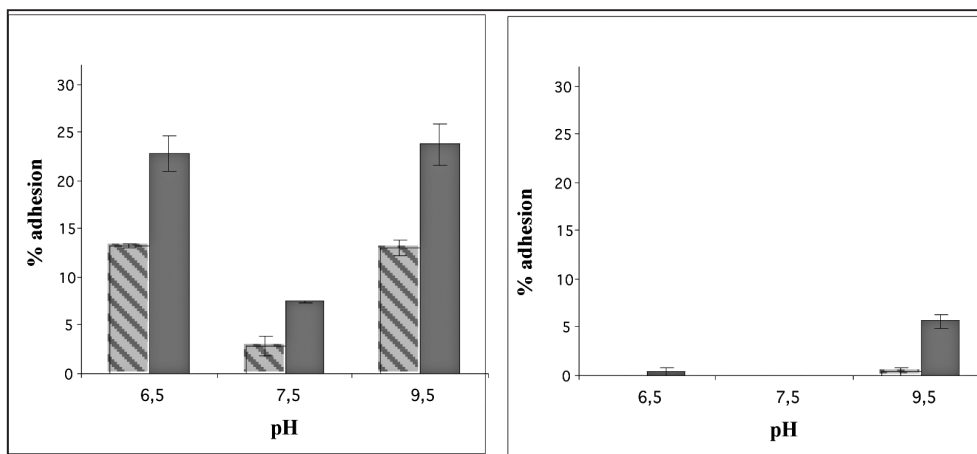


Figure 3. Effet du pH sur l'hydrophobicité bactérienne

rienne planctonique, il nous a paru intéressant d'étudier également son impact sur les propriétés de surface des bactéries avec ses conséquences sur le phénomène d'adhésion. La *figure 4* montre donc, avec les mêmes conventions que la *figure 2*, l'effet du chlore (à pH 7,5, 5 mM de NaCl) sur l'hydrophobicité des deux souches modèles.

P. Aeruginosa exprime un caractère hydrophile aux deux concentrations en chlore étudiées, ce caractère étant moins marqué à 0,3 mg/l. *E. Coli* présente, comme vu précédemment, un caractère hydrophile plus marqué par rapport à *P. aeruginosa*, et qui répond à l'augmentation du chlore de la même manière que *P. Aeruginosa*. L'augmentation de la teneur en chlore augmente l'hydrophobicité par réaction avec les protéines, notamment à la suite de l'oxydation de groupements thiols [PHATCHARAT *et al.*, 2006], ce qui peut expliquer l'augmentation de l'hydrophobicité à 0,3 mg/l. La diminution apparente de ce caractère à 5mM provient sans doute du relargage de macro-molécules faisant suite à la lyse cellulaire qui contribue de ce fait aux densités optiques mesurées pour les différentes phases.

5. Polysaccharides membranaires

Ce travail montre que les interactions qui sous-tendent l'adhésion des souches *E. Coli* et *P. Aeruginosa* diffèrent en ce sens que l'adhésion de *E. Coli* semble principalement gouvernée par les interactions acide-base. Au contraire, dans le cas de *P. Aeruginosa*, les

prédictions d'adhésion indiquent, dans certains cas au moins, que l'intervention d'interactions spécifiques (biologiques) est à prendre en compte. Nous avons donc eu recours à la spectroscopie ATR-FTIR pour rechercher des modifications dans la composition moléculaire des bactéries placées dans des conditions de pH et de forces ioniques qui diffèrent. Cette spectroscopie se révèle particulièrement utile pour mettre en évidence des modifications au niveau membranaire pour les bactéries [GUÉ *et al.*, 2001]. Les spectres IR de *P. Aeruginosa* à trois pH et trois forces ioniques ont été collectés dans le moyen infrarouge après 2 heures d'immersion dans les milieux de suspension distincts. Il est observé (*figure 5*) que les variations spectrales les plus importantes sont situées dans le domaine allant de 900 à 1 200 cm^{-1} qui correspond aux bandes d'absorption des polysaccharides de type capsulaire (CPS) ou lipopolysaccharides (LPS). Ces variations sont à interpréter en termes de modifications structurales et/ou de variations relatives des constituants polysaccharidiques.

Afin de mettre en évidence les effets du pH et de la force ionique sur ces composés, une analyse en composante principale a été effectuée en utilisant comme fréquences discriminantes le domaine spectral allant de 900 à 1 400 cm^{-1} .

Les composantes principales PC1 et PC2 (*figure 6* gauche) montrent des différences notables aux fréquences correspondant aux vibrations intra-cycles (1 080 cm^{-1}) et inter-cycles (1 140 cm^{-1}) des polysaccharides ainsi que dans le domaine moins spécifique

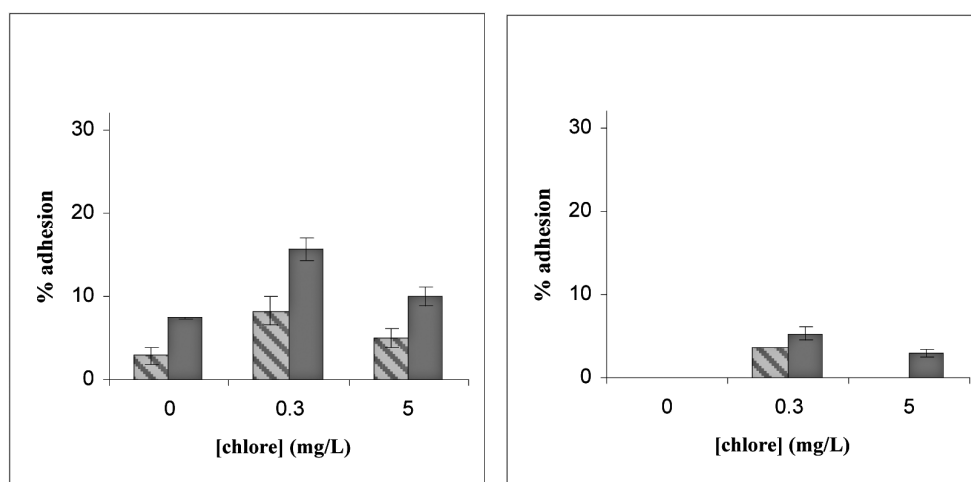


Figure 4. Effet du chlore sur l'hydrophobicité bactérienne

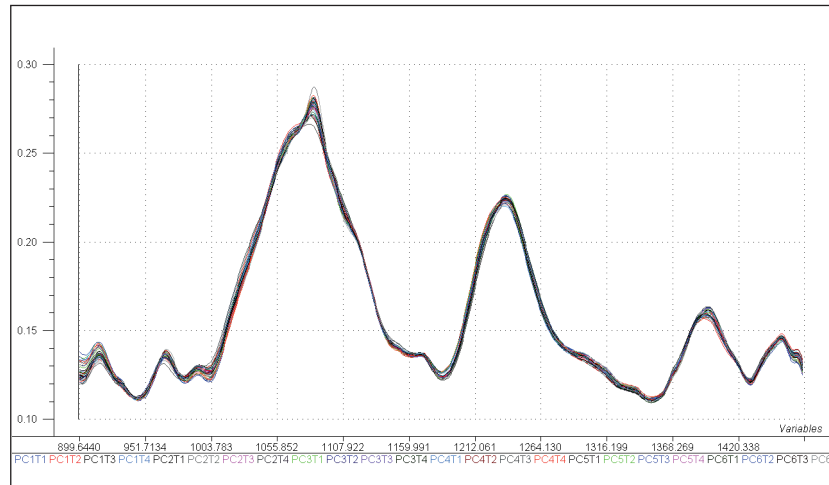


Figure 5. Spectres MIR de *P. Aeruginosa* à différents pH et forces ioniques

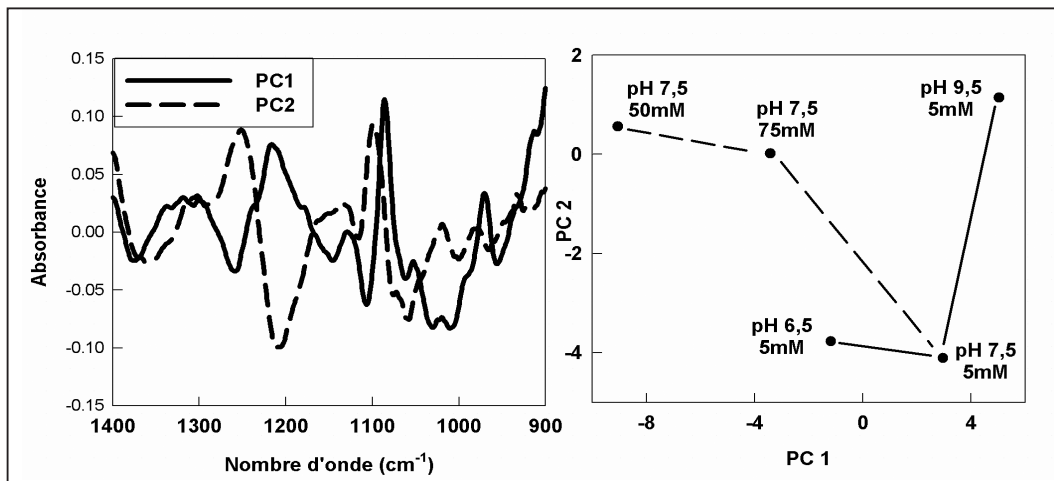


Figure 6. Analyse en composante principale de *P. Aeruginosa*

allant de 1 180 à 1 300 cm^{-1} . La dispersion des spectres dans l'espace de ces deux composantes (figure 6 droite) permet de mettre en évidence l'effet du pH (traits continus) et de la force ionique à pH 7,5 (tirets). Cette dispersion indique que les constituants membranaires de la bactérie sont impliqués dans l'adaptation au milieu environnant avec des conséquences attendues pour l'adhésion.

Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de préciser le type d'interactions qui prédominent dans le phénomène initial de l'adhésion conduisant plus tard à la formation d'un biofilm. Si les interactions physico-

chimiques jouent un rôle important, les interactions spécifiques ne sont pas à négliger pour autant. En effet, comme le montre ces résultats préliminaires obtenus par spectroscopie infrarouge, la capacité d'adaptation des bactéries, perceptible au niveau membranaire, est élevée. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués est donc indispensable pour la définition de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms. Ce travail, effectué sur des souches importantes pour la qualité de l'eau et dans des conditions physico-chimiques très proches de celles qui caractérisent les eaux potables, permet de focaliser l'attention sur certaines caractéristiques de l'interaction bactérie-matériau.

Bibliographie

BUSSCHER H.J., VAN DE BELT-GRITTER B., VAN DER MEI H.C., 1995 : « Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets ». *Colloid. Surface. B* ; 5 : 111-121.

BUSSCHER H.J., BOS R., VAN DER MEI H.C., HANDLEY P.S., 2000 : « Physicochemistry of microbial adhesion from an overall approach to the limits ». Baszkin A., Willem N., Eds, "Physical Chemistry of Biological Interfaces". Marcel Dekker, Inc, New York, Basel ; 431-458.

GEERTSEMA-DOORNBUSCH G.I., VAN DER MEI H.C., BUSSCHER H.J., 1993 : « Microbial cell surface hydrophobicity. The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) ». *J. Microbiol. Meth.* ; 18 : 61-69.

GILBERT P., MCBAIN A.J., RICKARD A.H., 2003 : « Formation of microbial biofilm in hygienic situations : a problem of control ». *International Biodeterioration & Biodegradation* ; 51 : 245-248.

GUE M., DUPONT V., DUFOUR A., SIRE O., 2001 : « Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation ». *Biochemistry* ; 40 : 11938-11945.

HAMADI F., LATRACHE H., EL GHMARI A., ELLOUALI M., MABRROUKI M., KOUIDER N., 2004 : « Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* ». *Ann. Microbiol.* ; 54 : 85-97.

MEDRZYCKA K.B., 1991 : « The effect of particle concentration in extremely dilute solutions ». *Colloid. Polym. Sci.* ; 156 : 319-330.

MYUNG WOO BYUN, JANG HO KIM, DONG HO KIM, HYUN JU KIM, CHEORUN JO, 2007 : « Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container ». *Food Microbiology* ; 24 : 544 – 548.

Norme marocaine Homologuée NM 03.7.001, SNIMA.

PHATCHARAT S., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W., 2006 : « Effects of washing with oxidising agents on the gel-forming ability and physicochemical properties of surimi produced from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) ». *Food Chemistry* ; 98 : 431 – 439.

RODIER J., 1996 : « L'analyse de l'eau ». Ed. Dunod, Paris ; 8^e édition.

VAN DER MEI H.C., VAN DE BLET-GRITTER B., BUSSCHER H.J., 1995 : « Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 2. Adhesion mechanisms ». *Colloid. Surface. B* ; 5 : 117 – 126.

VAN DER MEI H.C., VERIS J., BUSSCHER H.J., 1993 : « Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. ». *J. Appl. Environ. Microbiol.* ; 59 : 4305-4312.

VAN DER WAL A., NORDE W., ZEHNDER A.J.B., LYKLEMA J., 1997 : « Determination of the total charge in the cell walls of gram- positive bacteria. ». *Colloids Surf.* ; 9 : 81-100.

VAN OSS C.J., GOOD R.J., CHAUDHURY M.K., 1986 : « The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces ». *J. Colloid and Interface Science* ; 111 : 378-390.

Résumé

N. BOUTALEB, H. LATRACHE, O. SIRE.
**Bioadhésion bactérienne dans les réseaux
d'eau potable : effets des matériaux
et des facteurs environnementaux**

Les biofilms se développant dans les canalisations d'eau potable posent un réel problème de santé publique en sus des phénomènes de corrosion ou de pertes de charges qu'ils occasionnent [MYUNG WOO BYUN et *al.*, 2007 ; GILBERT et *al.*, 2003]. Comprendre plus finement les mécanismes qui sous-tendent l'adhésion bactérienne à un support abiotique permet de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms. Nous présentons ici une étude de la bioadhésion de deux bactéries modèles, *E. Coli* et *P. Aeruginosa* sur quatre types de supports polymères utilisés

au Maroc pour l'adduction d'eau potable. L'approche théorique DLVO développée par [VAN OSS et *al.*, 1986] est comparée aux résultats de tests d'adhésion sur les supports sélectionnés. L'impact de facteurs environnementaux tels que le pH, la force ionique ou la présence de chlore est étudié. Il est possible ainsi de suivre les modifications physico-chimiques des propriétés de surface des bactéries et de mieux comprendre le rôle respectif joué par les interactions physico-chimiques non spécifiques et les interactions biologiques spécifiques dans le phénomène d'adhésion. Une étude par spectroscopie FTIR-ATR révèle que les polysaccharides membranaires sont impliqués dans l'adaptation bactérienne aux changements des conditions physico-chimiques du milieu.