

## DE RESISTENTIE VAN BIOFILMS TEGEN WATERSTOFPEROXIDE

*Door de jaren heen zijn bacteriën steeds resistenter geworden tegen biociden door zeer doeltreffende afweermechanismes te ontwikkelen, waaronder biofilms. Biofilms zijn nochtans de hoofdleeftomgeving van micro-organismen. Er bestaan 1000 tot 10.000 keer meer bacteriën die groeien in biofilms dan als planktoncellen. In het geval van biofilms beschermen de bacteriën zichzelf met een laag polysachariden. Door deze matrix van exopolymeren kunnen biofilms tot 1000 keer resistenter zijn tegen biociden dan planktoncellen. Meerdere onderzoeken en een experimentele validatie hebben de ondoeltreffendheid van de biocides, inclusief waterstofperoxide voor wat betreft het volledig verwijderen van biofilms aangetoond. Na een continue dosis van 50mM-waterstofperoxide gedurende een uur blijkt dat de integriteit van de biofilm inderdaad zo goed als intact is en dat bijna 80% van de cellen het overleefd heeft. De praktijkcase heeft ook de doeltreffendheid van de enzymatische behandeling van Realco gevolgd door een integrale ontsmettingsfase van de biofilm aangetoond.*

Tal van chemische producten worden dagelijks gebruikt in de voedingsmiddelenindustrie: reinigingsproducten, ontsmettingsmiddelen, antimicrobische zeep, desinfectiemiddelen, antibiotica enzovoort. Maar wat doet het gebruik van deze biociden met de resistentie van bacteriën? De bezorgdheid hierover is de laatste jaren sterk toegenomen vanwege het stijgende aantal resistente bacteriestammen en ook hun vermogen te overleven in de voedingsmiddelenindustrie.<sup>1</sup> Het is namelijk aangetoond dat bacteriën in staat zijn biociden te overleven als ze in een biofilm leven.<sup>2</sup>

### De resistentie van bacteriën

De resistentie van bacteriën tegen biociden wordt al bestudeerd sinds de jaren '50.<sup>3</sup> Tegenwoordig zijn we bekend met het vermogen van micro-organismen om zich snel aan te passen aan hun omgeving door een resistentie te ontwikkelen tegen agressors van buitenaf. De bacteriën worden steeds resistenter tegen biociden, die de bacteriële flora slechts gedeeltelijk vernietigen.<sup>4</sup> Een recent onderzoek<sup>5</sup> heeft aangetoond dat bepaalde biociden niet doeltreffend zijn tegen de bacteriën van een biofilm en wel doeltreffend zijn tegen dezelfde bacteriële populatie in de vorm van plankton.

<sup>1</sup> J.M., *La résistance face aux biocides*, in Microbiologie, Services nr. 0214, maart 2011

<sup>2</sup> LEUNG C.Y., CHAN Y.C., SAMARANAYAKE L.P., SENEVIRATNE C.J., *Biocide resistance of Candida and Escherichia coli biofilms is associated with higher antioxidative capacities*, in J Hosp Infect., 81(2):79-86, mei 2012

<sup>3</sup> EUROPESE COMMISSIE, Directoraat-generaal voor Gezondheid en consumenten, *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR, januari 2009

<sup>4</sup> BRIANDET R., FECHNER L., NAITALI M., DREANNO C., *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, Carnets de Sciences, Editions Quae, 2012

<sup>5</sup> SMITH K., HUNTER I.S., *Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates*, in J Med Microbiol 2008; 57:966-73.

De bacteriële flora heeft verschillende afweermechanismen ontwikkeld tegen biociden:<sup>6</sup>

1. **Verminderde membraanpermeabiliteit:** De bacterie verhindert het binnendringen van de biocide door de doorlaatbaarheid van het cytoplasmamembraan te modificeren. De gemodificeerde doorlaatbaarheid beperkt het aantal biociden in de cel, waardoor de effectieve concentratie van de biocide wordt teruggebracht. De biocide is dan niet langer doeltreffend omdat de dodelijke dosis niet bereikt wordt.
2. **Efflux van de biociden:** De bacterie gebruikt effluxpompen die bepaalde actieve stoffen kunnen uitpompen. Een effluxpomp is een pomp in het cytoplasmamembraan, die voorkomt dat de biocide zijn doelwit bereikt door deze actief de bacterie uit te pompen. De biocide bereikt dan niet langer in voldoende hoeveelheid zijn doelwit om de bacterie te vernietigen.
3. **Enzymatische transformatie van de biociden:** De bacterie produceert nieuwe enzymen die in staat zijn de biocide te inactiveren (zoals bijvoorbeeld katalasen die waterstofperoxide afbreken). De biocide wordt dan inactief.
4. **Mutatie van het doelwit van de biocide:** Elke biocide werkt door zich te richten op een specifiek deel van de cel: de wand, het ribosoom... De modificatie volgend op een mutatie verandert de bindingsplaats en voorkomt zo dat de biocide zich hecht. De biocide is dan niet langer nuttig.

Naast deze vier afweermechanismen bestaat nog een zeer doeltreffend afweermechanisme, de biofilm genaamd, die alle voorgaande afweermechanismen kan samenbrengen en die ook de volgende kenmerkende heeft: de bacteriën beschermen zichzelf met een laag polysachariden en ontwikkelen ze zich als koloniën.

## Biofilms

De laag polysachariden die om de bacteriën van een biofilm heen zit is zeer moeilijk of eigenlijk niet te vernietigen met klassieke ontsmettingsmiddelen.<sup>7</sup> Biofilms zijn echter de hoofdleeftomgeving van micro-organismen.<sup>8</sup> Er bestaan namelijk 1000 tot 10.000 keer meer bacteriën die groeien in biofilms dan als planktoncellen.<sup>9</sup> Bacteriële biofilms kunnen tot 1000 keer resistenter zijn tegen biociden dan planktoncellen.<sup>10</sup> Dit komt vooral door de matrix van exopolymeren die de om de bacteriën van de biofilm heen zit.<sup>11</sup>

Omdat het zo moeilijk is om biofilms volledig te verwijderen, voeren maar weinig laboratoria tests uit om de doeltreffendheid van biociden voor het verwijderen ervan te bepalen. Er zijn momenteel geen Europese normen voor het testen van ontsmettingsmiddelen tegen biofilms in de voedingsmiddelenindustrie.<sup>12</sup> Uit de weinige tests die uitgevoerd zijn, zijn echter wel alarmerend hoge weerstandswaarden tegen ontsmettingsmiddelen en antibiotica gekomen. De

<sup>6</sup> EUROPESE COMMISSIE, Directoraat-generaal voor Gezondheid en consumenten, *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR, januari 2009

<sup>7</sup> BRIANDET R., FECHNER L., NAITALI M., DREANNO C., *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, Carnets de Sciences, Editions Quae, 2012

<sup>8</sup> BRIANDET R., FECHNER L., NAITALI M., DREANNO C., *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, Carnets de Sciences, Editions Quae, 2012

<sup>9</sup> COSTERTON J.W., GEESEY G.G., CHENG Cheng K.-J., *How bacteria stick*, in *Sci.Amer.*, 238:86-95, 1978

<sup>10</sup> ROUX A., GHIGO J.M., *Les biofilms bactériens*, in *Bull. Acad. Vét. France*, Tome 159, n°3, 2006

<sup>11</sup> BRIANDET R., FECHNER L., NAITALI M., DREANNO C., *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, Carnets de Sciences, Editions Quae, 2012

<sup>12</sup> EUROPESE COMMISSIE, Directoraat-generaal voor Gezondheid en consumenten, *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR, januari 2009

matrix van de biofilm blijkt een barrière voor de verspreiding te zijn.<sup>13</sup>

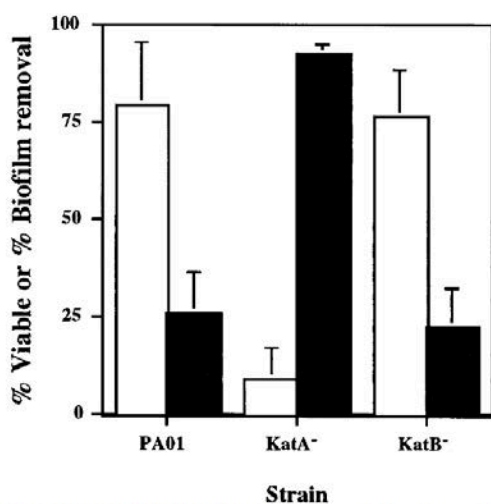


Foto: De 5 ontwikkelingsfasen van biofilms op een hard oppervlak; initiële hechting, onomkeerbare hechting, verschijning en rijpingsfase I van de biofilm, rijpingsfase II, erosie en verspreiding / autogeen vrijkomen. De microfoto's (allemaal op dezelfde schaal) zijn van een *Pseudomonas aeruginosa*-biofilm in ontwikkeling.

## De resistentie van biofilms tegen waterstofperoxide

Meerdere onderzoeken (Journal of Bacteriology<sup>14</sup>, Applied and Environmental Microbiology<sup>15</sup> en Journal of Hospital Infection<sup>16</sup>) hebben aangetoond dat biofilms resistent zijn tegen waterstofperoxide. Het onderzoek gepubliceerd in Applied and Environmental Microbiology<sup>17</sup> heeft geanalyseerd welke rol twee katalasen in de *Pseudomonas aeruginosa*-bacterie spelen bij de bescherming van de biofilmcellen tegen waterstofperoxide. In aanwezigheid van waterstofperoxide geven de bacteriën twee enzymen af, namelijk *KatA* en *KatB*, die deze biocide neutraliseren. Dit onderzoek is gedaan na één uur blootstelling aan een continue dosis van 50mM-waterstofperoxide en heeft aangetoond dat de integriteit van de biofilm zo goed als intact blijft en dat bijna 80% van de cellen overleeft. Zelfs zonder katalaseactiviteit zijn de biofilms nog steeds relatief resistent tegen waterstofperoxide.

**FIG. 1:** De witte staven geven het levensvatbaarheidspercentage van de resterende cellen aan en de donkere staven het biofilmverwijderingspercentage.<sup>18</sup>



<sup>13</sup> BRIANDET R., FECHNER L., NAITALI M., DREANNO C., *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, Carnets de Sciences, Editions Quae, 2012

<sup>14</sup> KHAKIMOVA M., AHLGREN H.G., HARRISON J.J., ENGLISH A.M., NGUYEN D., *The stringent response controls catalases in Pseudomonas aeruginosa and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance*, in J. Bacteriol., 195(9):2011, maart 2013

<sup>15</sup> ELKINS J.G., HASSETT D.J., STEWART P.S., SCHWEIZER H.P., MCDERMOTT T.R., *Protective role of catalase in Pseudomonas aeruginosa biofilm resistance to hydrogen peroxide*, in Appl Environ Microbiol., 65(10):4594-600, oktober 1999

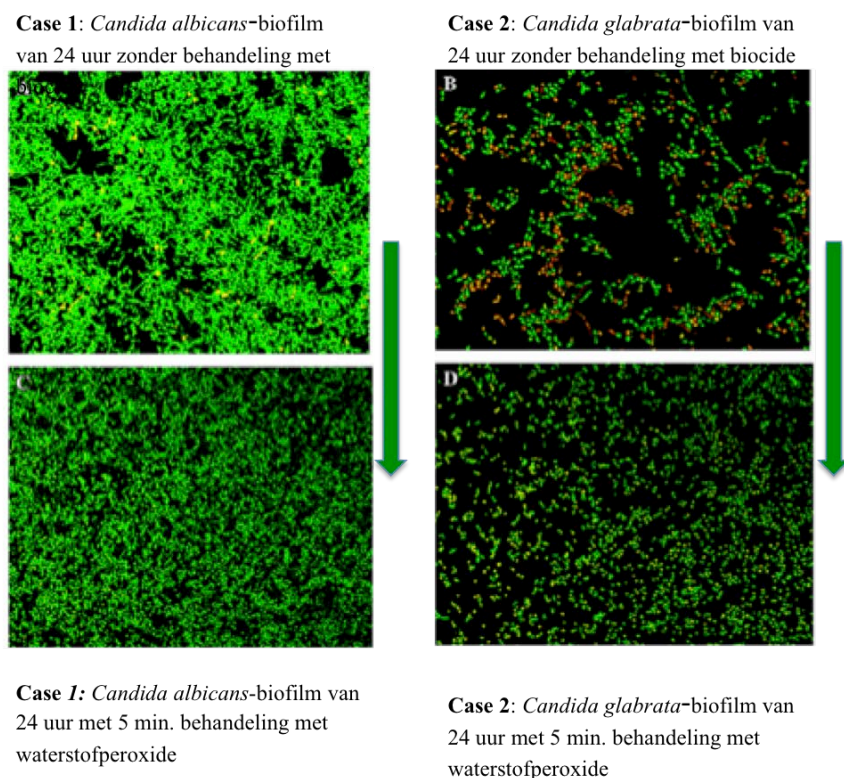
<sup>16</sup> LEUNG C.Y., CHAN Y.C., SAMARANAYAKE L.P., SENEVIRATNE C.J., *Biocide resistance of Candida and Escherichia coli biofilms is associated with higher antioxidative capacities*, in J Hosp Infect., 81(2):79-86, mei 2012

<sup>17</sup> ELKINS J.G., HASSETT D.J., STEWART P.S., SCHWEIZER H.P., MCDERMOTT T.R., *Protective role of catalase in Pseudomonas aeruginosa biofilm resistance to hydrogen peroxide*, in Appl Environ Microbiol., 65(10):4594-600, oktober 1999

<sup>18</sup> ELKINS J.G., HASSETT D.J., STEWART P.S., SCHWEIZER H.P., MCDERMOTT T.R., *Protective role of catalase in Pseudomonas aeruginosa biofilm resistance to hydrogen peroxide*, in Appl Environ Microbiol., 65(10):4594-600, oktober 1999

Een ander onderzoek gepubliceerd in de *Journal of Hospital Infection*<sup>19</sup> heeft ook aangetoond na 5 minuten blootstelling aan de aanbevolen concentraties waterstofperoxide (0,017% tot 8,75%) bij de klinische ontsmetting, de microbiële cellen intact en levend blijven.

**FIG. 2**<sup>20</sup>: Beelddigitalisatie met confocale lasermicroscopie



## Enzymatische reiniging

Vanwege de ontoeltreffendheid van ontsmettingsmiddelen en met name van waterstofperoxide tegen biofilms, is gezocht naar andere methodes.<sup>21</sup> De enzymatische behandeling lijkt een doeltreffende oplossing te zijn voor het verwijderen van biofilms.<sup>22</sup> Alleen een complexe en zeer specifieke enzymcocktail echter kan de beschermende matrix van de biofilm afbreken. Daarna volgt een ontsmettingsfase om de bacteriën die planktoncellen en dus gevoelig voor biociden geworden zijn te vernietigen.

<sup>19</sup> LEUNG C.Y., CHAN Y.C., SAMARANAYAKE L.P., SENEVIRATNE C.J., *Biocide resistance of Candida and Escherichia coli biofilms is associated with higher antioxidative capacities*, in *J Hosp Infect.*, 81(2):79-86, mei 2012

<sup>20</sup> LEUNG C.Y., CHAN Y.C., SAMARANAYAKE L.P., SENEVIRATNE C.J., *Biocide resistance of Candida and Escherichia coli biofilms is associated with higher antioxidative capacities*, in *J Hosp Infect.*, 81(2):79-86, mei 2012

<sup>21</sup> LEQUETTE Y., BOELS G., CLARISSE M., FAILLE C., *Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry*, in *Biofouling*, 26(4):421-31., mei 2010

<sup>22</sup> BRIANDET R., FECHNER L., NAITALI M., DREANNO C., *Biofilms, quand les microbes s'organisent*, Carnets de Sciences, Editions Quae, 2012

## **Praktijkvalidatie: de ondoeltreffendheid van biociden (in dit geval waterstofperoxide) voor het verwijderen van biofilms<sup>23</sup>**

Voor deze praktijkcase gebruiken we Sterilex-producten op basis van waterstofperoxide om de doeltreffendheid te bepalen van een biocide voor het verwijderen van biofilms.

### Protocol

#### 1) Preparatie van de biofilm

De vorming van de biofilm gebeurt op dynamische wijze op PTFE-buizen (polytetrafluorethyleen) bij 30 °C met *Pseudomonas fluorescens*-bacteriën. Na 7 dagen circulatie kunnen we ervan uitgaan dat de biofilm zich gevormd heeft in de buis. De PTFE-buis wordt vervolgens in meerdere stukken gesneden van 7 cm lang. Voor elk product worden drie niet-openvolgende stukken buis geselecteerd, die vervolgens aangesloten worden op de peristaltische pomp om de reinigingstests in circulatie uit te voeren.

#### 2) Verwijderen van de biofilm

- Spoelen met water: 5 minuten op omgevingstemperatuur
- Toevoegen van 10% Sterilex Ultra Disinfectant Cleaner Solution 1 + 10 % Sterilex Ultra Activator
- Geteste circulatiespoeltijden van 10, 15 en 20 minuten
- Temperatuur van het water bij het begin: 50 °C

#### 3) Detectie van de biofilm

- De PTFE-buizen worden in de lengte opengesneden om de binnenkant ervan beter te kunnen zien. De biofilmresten verkleuren vervolgens met behulp van de 'Biofilmdetectiekit'<sup>\*</sup>, die gebruikt wordt om aanwezige biofilms zichtbaar te maken.
- 5 minuten inweken in REACTIVE 1 (product in de Biofilmdetectiekit)
- 5 minuten inweken in REACTIVE 2 (product in de Biofilmdetectiekit)

<sup>23</sup> Labrapport opgesteld door Realco, biofilmvergelijking Sterilex versus Enzyfoam, 27/05/2014

<sup>\*</sup> De Biofilmdetectiekit verkleurt onmiddellijk de beschermende matrix van de biofilm. De kit is gevalideerd door het INRA (Institut National de la Recherche Agronomique in Frankrijk) en het Biotech-Germande-lab (specialist op het gebied van hygiëne in ziekenhuisomgevingen).

## Resultaten

### 1) Bewijs



Foto 1. Verkleuring van de biofilm vóór de reiniging.

### 2) Spoelen met water van 50 °C

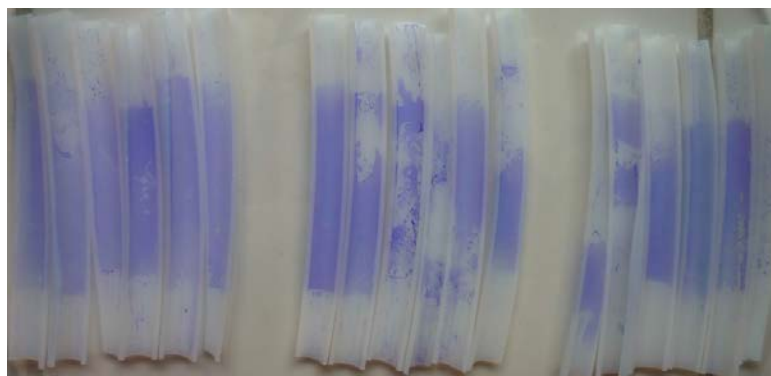


Foto 2. Verkleurde biofilmresten na het spoelen met water van 50 °C. Van links naar rechts: 10, 15 en 20 minuten circulatie.

### 3) Toevoegen van 10% Sterilex Ultra Disinfectant Cleaner Solution 1 + 10% Sterilex Ultra Activator



Foto 3. Verkleurde biofilmresten na reiniging met de Sterilex-producten. Van links naar rechts: 10, 15 en 20 minuten circulatie.

In de buizen die gereinigd zijn met de mix van Sterilex-producten is een aanzienlijke hoeveelheid biofilm (blauwe verkleuring) achtergebleven, zelfs na 20 minuten reiniging. Er is geen verschil merkbaar tussen de reinigingstijden van 10, 15 of 20 minuten.

Parallel hieraan is ook de enzymcocktail van Realco getest volgens hetzelfde protocol en in dezelfde condities. Het enige verschil is de gebruikte dosering (minder geconcentreerd): er is 1% Enzyfoam opgelost en 0,2% Biorem 20.

#### 4) Toevoegen van 1% Enzyfoam + 0,2% Biorem 20



Foto 4. Verkleurde biofilmresten na reiniging met de Realco-producten. Van links naar rechts: 10, 15 en 20 minuten circulatie.

De complexe en zeer specifieke enzymatische behandeling van Realco heeft de EPS-matrix in 10 minuten vernietigd. Na een gerichte en gecontroleerde ontsmettingsfase zal de biofilm dus volledig verdwenen zijn.

#### Conclusie van het experiment

In circulatie zijn de enzymatische producten aanzienlijk doeltreffender voor het verwijderen van biofilms dan de mix op basis van waterstofperoxide.

#### **Algemene conclusie**

Zoals beschreven in dit artikel zijn biofilms de hoofd leefomgeving van micro-organismen. Er bestaan 1000 tot 10.000 keer meer bacteriën die groeien in biofilms dan als planktoncellen. Het is dus van essentieel belang deze te kunnen verwijderen want ze kunnen ernstige consequenties met zich meebrengen in de voedingsmiddelenindustrie en tot aanzienlijk economisch verlies leiden. Uit meerdere literatuurbronnen en een laboratoriumpraktijkcase blijkt echter de ondoeltreffendheid van biociden en met name van waterstofperoxide voor het volledig verwijderen van biofilms. In het geval van biofilms beschermen de bacteriën zichzelf namelijk met een laag polysachariden, een barrière die extreem moeilijk te vernietigen is. Het labexperiment heeft aangetoond dat de enzymatische behandeling van Realco de enige is die deze barrière kan opheffen. Pas als de matrix vernietigd is, is een ontsmettingsfase nodig om de vrijgekomen bacteriën te vernietigen.