

CHRISTOPHE SOUMET¹, VALÉRIE GAUDIN¹, PAULINE LANCIEN¹

PIERRE MARIS, KAHINA SLIMANI², NICOLAS ROSSI³, DOMINIQUE HURTAUD-PESEL²

¹ ANSES LABORATOIRE DE FOUGÈRES - UNITÉ ANTIBIOTIQUES, BIOCIDES, RÉSIDUS ET RÉSISTANCE (AB2R)

² ANSES LABORATOIRE DE FOUGÈRES - UNITÉ ANALYSE DES RÉSIDUS DE CONTAMINANTS (ARC)

³ ACTALIA

La réalisation de cet inventaire de tests et kits pour la détection des résidus de biocides désinfectants s'appuie notamment sur des travaux bibliographiques réalisés dans le cadre d'un stage de master 2 effectué par Pauline Lancien en 2016 dans l'unité AB2R, qui portait sur « l'évaluation des performances des méthodes de détection des résidus de biocides désinfectants, à partir des surfaces et des eaux de rinçage ». Ce master faisait partie d'une des actions du projet Resbiolact: « actions concertées avec le CNIEL (Centre national interprofessionnel de l'économie laitière) sur la thématique des résidus de biocides dans les produits laitiers » qui associait également l'unité Analyse des résidus de contaminants (ARC) du laboratoire d'ACTALIA à Saint-Lô ainsi que le CNIEL.

Dans ce document est listé le principe des différents tests et kits utilisables pour la détection de résidus de biocides, à partir des eaux de rinçage collectées après les opérations de nettoyage et désinfection.

TEST BANDELETTES : MERCKOQUANT® ET QUANTOFIX®

PRINCIPE

Des tests par bandelettes plastiques, spécifiques de molécules chimiques, sont commercialisés ; ils permettent, par une réaction colorimétrique, de vérifier la présence de résidus de biocide (*MQuant*® (Merck, Hohenbrunn, Allemagne), *Quantofix*® (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Ils existent notamment pour la détection d'acide peracétique, de chlore et de composés d'ammoniums quaternaires (AQ) [chlorure de benzalkonium (BAC) : mélange de BAC-C12 (65-70 %) et BAC-C14 (30 à 35 %), chlorure de didécyl diméthyl ammonium (DDAC)]. La concentration de ces molécules biocides peut être déterminée de manière semi-quantitative à l'aide de bandelettes tests spécifiques. La mesure se fait par comparaison visuelle de la zone réactionnelle de la bandelette test avec les zones d'une échelle colorimétrique. Les bandelettes tests sont utilisées en respectant les instructions du fabricant ; elles sont plongées dans les liquides de rinçage, ou peuvent être posées sur les supports rentrant en contact avec les aliments, pendant un temps donné (variant en fonction du composé biocide testé et du fournisseur), à température ambiante. La bandelette est ensuite agitée afin d'éliminer l'excédent de liquide et la zone colorée de l'étiquette se rapprochant le plus de la couleur de la zone réactionnelle est identifiée soit immédiatement soit après un temps d'attente pouvant varier de deux secondes à une minute.

AVANTAGES

- Test simple largement utilisé par les opérateurs en IAA
- Rapide
- Dosage semi-quantitatif

INCONVÉNIENTS

- Seuils de sensibilités élevés (de l'ordre du ppm ou µg/ml) :
 - . 25 µg/ml AQ (données personnelles) et 10 µg/ml d'après le fournisseur;
 - . 5 µg/ml acide peracétique (données personnelles et fournisseur);
- Réactions croisées avec la triamine (N- (3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine) pour la bandelette dédiée à la détection des AQ.

MESURE DU PH

PRINCIPE

La mesure du pH de solutions de biocides, d'échantillons d'eaux de rinçage et des supports après des opérations de nettoyage et désinfection de surfaces ouvertes, peut être réalisée à l'aide de bandelettes (*MColorpHast, Merck*) selon les instructions du fournisseur; la bandelette est plongée dans le liquide de rinçage ou posée sur le support sur lequel a été déposé 50 µl d'eau pendant deux secondes au minimum, puis agitée pour enlever l'excédent de liquide. La détermination du pH est réalisée en comparant la couleur de la zone réactionnelle de la bandelette à l'échelle colorimétrique donnée par le fournisseur. Le suivi du pH peut également se faire par la mesure, via une sonde pH, pour le contrôle des surfaces fermées, comme par exemple pour un circuit de nettoyage en place (NEP). L'indication du pH permet de vérifier que les surfaces ont bien été rincées mais ne peut être une preuve d'absence totale de résidus.

AVANTAGES

- Simple
- Rapide
- Mesure possible en continu (NEP)
- Peu coûteux

INCONVÉNIENTS

- Non spécifique
- Applicable uniquement aux produits mettant en jeu des protons (H⁺)

MESURE DE LA CONDUCTIVITÉ

Dans le cadre du stage de master 2, la conductivité de solutions de biocides et d'échantillons d'eaux de rinçage a été déterminée grâce à un conductimètre (HQ40d, *Hach*). Le conductimètre est étalonné avec une solution étalon (KCl à 0,01 m) à 1413 µs/cm avant d'effectuer les mesures. La sonde est plongée dans la solution à tester, à température ambiante.

La conductivité est un des paramètres couramment mesuré en industrie alimentaire, notamment dans le cadre des NEP, pour suivre la concentration de désinfectant injecté dans le système mais également l'efficacité du processus de rinçage, qui se traduit par la diminution voire la disparition du désinfectant. Malgré son manque de spécificité, elle est couramment utilisée pour le suivi et la surveillance de différents types d'eau, notamment les eaux de rinçage.

AVANTAGES

- Simple d'utilisation
- Mesure possible en continu (NEP)

INCONVÉNIENT

- Non spécifique

TEST ELISA

Le test Elisa colorimétrique par compétition (*MaxSignal Benzalkonium chloride Elisa Test Kit, Novakits, Bioo Scientific Corp.*), est commercialisé pour la détection de BAC dans des échantillons alimentaires (lait, crevettes, eau). Le BAC présent dans l'échantillon à analyser entre en compétition avec le complexe anticorps-BAC. Plus la concentration de BAC dans l'échantillon est élevée, plus l'intensité colorimétrique mesurée à 450 nm diminue. Cette intensité est maximale en absence de BAC.

Le protocole est le suivant: 1 ml d'échantillon est placé dans un tube de 15 ml et centrifugé pendant cinq minutes à 4000 g à température ambiante. Puis, 100 µl de surnageant sont transférés dans un tube de 2 ml et 900 µl de tampon BKC 1X sont ajoutés. Le mélange est vortexé vigoureusement pendant une minute. Pour le test, 100 µl de chaque échantillon ainsi préparé sont ajoutés dans deux puits pour avoir des répliques techniques. Puis, 50 µl du complexe BKC-HRP (Peroxydase de raifort) sont ajoutés et la plaque est agitée pendant une minute. La plaque est ensuite incubée pendant 30 minutes à température ambiante. La solution de chaque puits est éliminée et la plaque est ensuite lavée trois fois avec 250 µl de solution de rinçage 1X. Après le dernier rinçage, elle est retournée délicatement pour enlever l'excédent de liquide. 100 µl de substrat TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, révélateur de la peroxydase) sont ajoutés et la solution est mélangée par agitation de la microplaque pendant une minute. Après incubation de 20 minutes à température ambiante, 100 µl de solution Stop permettent d'arrêter la réaction enzymatique. La densité optique est lue par le spectrophotomètre (*Fluostar Optima, BMG*) à une longueur d'onde de 450 nm.

Ce test a été appliqué, dans le cadre du projet de master, sur une gamme de concentrations pour la substance active BAC diluées dans l'eau dure 30°TH et sur quelques échantillons d'eaux de rinçage, récoltées suite aux opérations de nettoyage et désinfection réalisées au cours d'expérimentation en laboratoire.

AVANTAGES

- Seuil de détection bas
 - . 1 ppb ou ng/ml (crevettes) et 10 ppb (eau et lait) de BAC (données fournisseur)
 - . 2 ppb de BAC (eau dure 30 °TH) (données personnelles)
- Rapide

INCONVÉNIENTS

- Plus ou moins spécifique : réactions croisées avec le DDAC et N- (3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (résultats personnels)
- Coût modéré

**TEST D'INHIBITION DE LUMINESCENCE BACTÉRIENNE
(SELON LA NORME EN ISO 11348-2 : 1999)**

Ce sont des tests d'inhibition de la bioluminescence. Ils sont basés sur l'emploi d'une bactérie à coloration Gram négative, le plus souvent *Vibrio fischeri*, portant un marqueur émettant de la luminescence. La perte de cette luminescence est en lien avec la présence d'une substance toxique, qui peut être un résidu de biocide, à partir d'échantillons prélevés sur le terrain. Différentes méthodes sont décrites utilisant cette bactérie, comme *BioTox*®, *Lumistox*® ou encore *MicroTox*®. L'enzyme responsable de ce phénomène de bioluminescence est la *luciférase*, qui catalyse la réaction suivante :



La bioluminescence est directement proportionnelle au statut métabolique de la cellule. En présence de substances toxiques, le métabolisme de la bactérie est affecté, ce qui se traduit par la chute de la luminescence.

Le test de toxicité utilisé dans le cadre de nos travaux était basé sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri* (NRRLB-11177) avec le kit LCK 482 de Dr Lange GmbH (Düsseldorf, Allemagne). L'inhibition de la luminescence est détectée après un temps de contact pour différentes concentrations d'échantillon. La concentration efficace médiane (EC50) conduisant à une inhibition de 50 % de la luminescence est classiquement déterminée.

ISO
11348 : 1999

Au regard du guide fourni avec le kit, le pH des échantillons doit se situer à $7 \pm 0,1$.

Figure 1 : Lumistox® et Lumistherm® utilisés lors de tests d'inhibition de luminescence bactérienne.

Les échantillons sont supplémentés avec une solution de NaCl pour avoir une concentration finale de 2 % NaCl (p/v). Les bactéries luminescentes lyophilisées sont réhydratées en utilisant la solution de réactivation du kit. À l'aide d'un incubateur (*Lumistherm*, Dr Lange GmbH, Düsseldorf,

Allemagne ; figure 1), des aliquots de 500 µl de bactéries luminescentes et d'échantillons sont pré-incubés pendant 15 minutes à 15 °C. Après mesure de la luminescence à $t = \min (t_0)$ à l'aide du luminomètre (*Lumistox 300*, Dr Lange GmbH, Düsseldorf, Allemagne), 500 µl d'échantillon sont ajoutés à chaque aliquot de 500 µl de suspension bactérienne. Après un temps d'incubation de 15 minutes à 15 °C, la bioluminescence (I_{15}) est mesurée. La toxicité relative de l'échantillon est exprimée en pourcentage d'inhibition comparée au contrôle négatif, non toxique (suspension bactérienne avec une solution à 2 % NaCl), et mesuré à chaque essai. Un contrôle positif (3,5-dichlorophénol) est également testé, au moins une fois par jour d'essai. Le pourcentage d'inhibition de chaque duplicat est donné par le luminomètre ainsi que la moyenne des pourcentages d'inhibition des duplicats.

AVANTAGE

- Résultat rapide (une heure)

INCONVÉNIENT

- Non spécifique (mesure de la toxicité bactérienne)

TESTS DE DÉTECTION DE NATURE PHYSICO-CHIMIQUE

Les méthodes analytiques employées comme référence dans le dosage et l'identification des résidus de biocides sont de haut niveau de performance, avec une grande spécificité et précision (chromatographie liquide, chromatographie gazeuse avec détecteur de spectrométrie de masse). Dans le cadre du projet Resbiolact cité en introduction, des méthodes basées sur la spectrométrie de masse ont été développées au laboratoire, pour la détection de résidus de composés d'ammoniums quaternaires (DDAC et BAC) (Slimani et al., 2017) et d'une triamine (N- (3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine) (Slimani et al., 2018) dans le lait et produits dérivés (poudres de lait et fromages).

Ces méthodes peuvent être appliquées pour la détection de ces mêmes résidus de la famille des ammoniums quaternaires, à partir d'eaux de rinçage.

AVANTAGES

- Seuil de détection bas : ppb
- Spécificité
- Identification et quantification de biocides

INCONVÉNIENTS

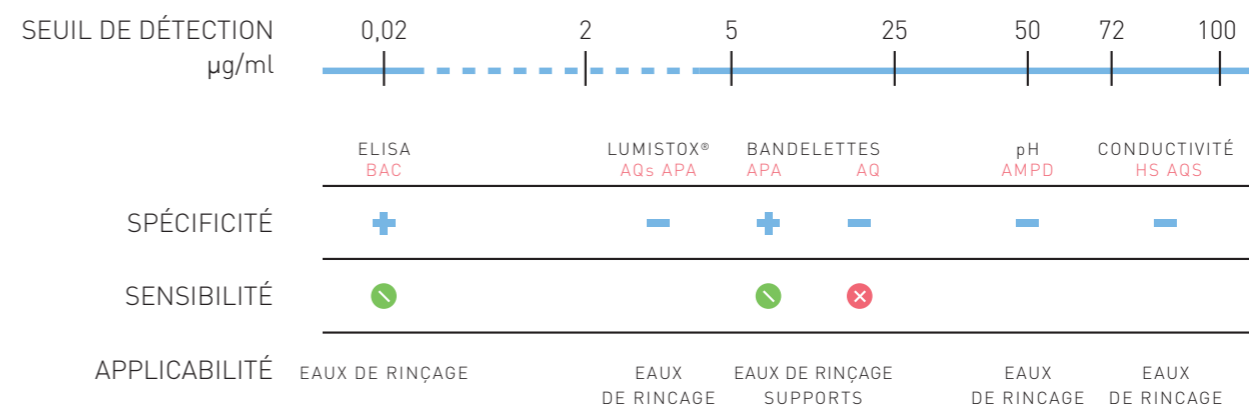
- Mise en œuvre lourde
- Coût élevé
- Analyse possible d'un faible nombre d'échantillons
- Non adapté pour des autocontrôles en IAA

RÉFÉRENCES

Slimani (K.), Pirotais (Y.), Maris (P.), Abjean (J.-P.) & Hurtaud-Pessel (D.), *Liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the analysis of N- (3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products*, Amsterdam, Elsevier « *Food Chemistry* », octobre 2018, vol. 262, p. 168-177.

Slimani (K.), Féret (A.), Pirotais (Y.), Maris (P.), Abjean (J.-P.) & Hurtaud-Pessel (D.) (2017) *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for the analysis of quaternary ammonium compounds in cheese and milk products: Development and validation using the total error approach*, Amsterdam, Elsevier « *Journal of Chromatography* », 29 septembre 2017, A vol. 1517, p. 86-96.

FIGURE 1 : DIAGRAMME DE LA SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DES DIFFÉRENTS TESTS D'AUTOCONTRÔLES POUR LA DÉTECTION DE RÉSIDUS DE BIOCIDES



ANNEXE

TABLEAU 1 : DÉTERMINATION DES SEUILS DE DÉTECTION À PARTIR DES DILUTIONS DE BIOCIDES EN EAU DURE 30 °F

BIOCIDE	CONCENTRATION [µg/ ml] DÉTECTÉE AVEC					
	Merckoquant®	Quantofix®	pH	Conductimétrie	Lumistox®	Elisa
DDAC or BAC	25 (10) a	25 (10)	--d	100	1,1-1,4 (2,3)	0,002f (0,01)
AMPD	rcb	rc	10		36,8 (-)	nd
APA	5 (5)	5 (5)	--		2,3 (1,8)	nd
HS	-c	-	--	7	14 800 (-)	nd
Réactions croisées	AMPD	AMPD			nde	Absence
Commentaires	Lectures visuelles difficiles pour APA		Non adapté	Adapté uniquement pour HS	Non adapté	Spécifique du BAC

a : cette étude (fournisseur) ; b : réaction croisée ; c : résultat négatif ; d : absence de données ; e : DDAC non détecté par Elisa ; f : non déterminé ; APA : acide peracétique ; HS : hypochlorite de sodium ; AMPD : N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine ; DDAC : chlore de didécylméthyl ammonium ; BAC : chlorure de benzalkonium

CONTACTS

ACTALIA

310 rue Popielujko . 50000 Saint-Lô Cedex . téléphone : 02 33 06 71 71
Contact : Nicolas Rossi . n.rossi@actalia.eu

ANSES

Laboratoire de Fougères . bâtiment bioagropolis . 10 b rue Claude-Bourgelat
C.S. 40608 Javené . 35133 Fougères . téléphone : 02 99 17 27 47
Contacts : christophe.soumet@anses.fr & dominique.pessel@anses.fr