

Évaluation de l'efficacité des traitements de désinfection sur les installations de tours aéroréfrigérantes par PCR temps réel

Laurent Garrelly, département R&D,
Cyrille Grimaud, Bouisson-Bertrand laboratoires
Jean Michel Clerc,
Transferts Languedoc Roussillon, et
Marc Raymond, International Product
Manager Environnement et eaux, BIO-RAD

Le but de document est d'exposer une démarche d'investigation qui peut être utilisée pour évaluer et comprendre l'état et l'évolution de l'écosystème microbien dans les tours aéroréfrigérantes (TAR), grâce l'utilisation d'outils modernes et innovants. La méthode de détection des légionelles par PCR en temps réel est utilisée comme un outil de diagnostic, de management des risques et de mesure d'efficacité des différents traitements.

Il est nécessaire d'étudier le plan d'installation de la TAR, afin d'y effectuer des séries de prélèvement, à des points différents choisis avec l'appui de l'analyse des risques et pour vérifier les objectifs poursuivis par le traitement de l'eau. L'évaluation de l'écosystème microbien et des populations de légionelles nous permettent de conduire et d'optimiser les actions préventives ou correctives nécessaires.

ABSTRACT

Evaluation of the efficiency of disinfection treatment on cooling towers by real time PCR.

The purpose of this document is to describe the investigation process that can be used for evaluating and understanding the state and development of the microbial ecosystem in cooling towers (CTs) thanks to the use of modern and innovative tools.

The method of detecting legionella by PCR in real time is used as a diagnosis, risk management and efficiency measurement tool for various treatments.

The installation plan of the CT has to be studied in order to take series of samples on it at points chosen with the support of risk analysis and to check the objectives aimed at by the water treatment method.

The evaluation of the microbial ecosystem and the legionella populations enable us to carry out and optimize the necessary preventive and corrective actions.

Les connaissances acquises sur les légionelles grâce à une étude bibliographique nous permettent de synthétiser les éléments sur leur mode de vie, les conditions de prolifération et sur l'évaluation de l'efficacité d'un traitement.

Connaissances bibliographiques relatives à *Legionella*

Legionella, bactérie ubiquitaire autochtone des milieux hydriques continentaux, colo-

nise facilement les circuits industriels notamment par les TAR (14.000 TAR concernées par la réglementation applicable : Rubrique 2921 et arrêtés ministériels), représente un risque en Santé Publique, objet de mesures de prévention dans le cadre du plan d'action gouvernemental contre la légionellose.

Le genre *Legionella* est composé de 48 espèces. Parmi celles-ci, c'est à *Legionella pneumophila* que l'on attribue 95 % des cas

Issus des connaissances de 25 ans de recherche internationale active, six éléments s'avèrent incontournables pour étudier le "risque légionelle".

1. *Legionella* est une bactérie ubiquitaire des eaux de l'environnement.
2. Son développement est intracellulaire (endosymbiotique) chez des hôtes tels que les amibes, les ciliés, les algues, les champignons, ou encore malheureusement les macrophages alvéolaires humains.
3. L'endosymbiose implique un tropisme particulier pour les biofilms, du fait de la présence dans ce compartiment de tous les éléments nécessaires à sa pro-

lifération.

4. La croissance endosymbiotique n'est pas systématiquement accompagnée d'une capacité à cultiver sur gélose hétérotrophique.
5. L'écosystème constitué par une TAR fluctue très largement avec les événements perturbateurs (traitements) induit par l'exploitant, et subit (modification du milieu par apport d'eau de qualité non maîtrisée ou d'air contaminé)
6. *Legionella* utilise la vacuole amibienne ou ciliée pour voyager via les aérosols sur de longues distances.

Tableau diagnostique d'évaluation

Type de tours aéroréfrigérantes concernées	Points de prélèvement	Phénomènes biologiques observés	Objectifs visés
TAR soumises à autorisation ou déclaration, à fonctionnement saisonnier ou permanent (avec ou sans possibilité d'arrêt)			
TAR ouverte	Eau d'appoint	Cultivabilité des Légionelles Présence de biofilms	Efficacité de surveillance Etablissement des niveaux limites d'alerte Niveau d'action
TAR hybride ouverte TAR ouverte + échangeur	Points du circuit TAR Biofilms Aérosol	Présence d'amibes Comportement de l'installation vis-à-vis de l'augmentation des populations de la flore totale et des légionelles Présence de légionelles dans les aérosols	Compréhension du réacteur biologique Maîtrise des points de contamination

Le diagnostic évaluation a pour objectif d'estimer le risque réel de développement des *Legionella* en tenant compte de l'écologie de *Legionella* (différents compartiments tels que : eaux, biofilms et air).

de légionellose même si 18 espèces ont déjà été identifiées comme "pathogènes". Les légionelles ont un développement endosymbiotique dans les amibes et ne semblent se diviser qu'en leur présence. Le transport des légionelles via les aérosols serait possible sur de longues distances grâce à un empaquetage dans une vésicule issue de Ciliés. Les données actuelles sur l'écologie des légionelles la présente comme une bactérie naturellement présente dans les eaux froides souterraines ou superficielles. Ce sont les sources de contamination des installations à partir desquelles les eaux sont prélevées pour le fonctionnement des TAR. Les légionelles majoritairement dans les bio-

films peuvent survivre dans l'environnement plusieurs mois par "starvation" grâce à des réserves d'énergies accumulées sous forme de polymères osidiques.

Dans l'environnement, *Legionella pneumophila* est très largement minoritaire si l'on se base sur des analyses de biologie moléculaire. Par la méthode de référence NF T90-431, l'espèce *L. pneumophila* représente la majorité des échantillons positifs. En effet, cette méthode est beaucoup plus efficace pour cultiver *Legionella pneumophila* que pour révéler la présence de *Legionella spp.* non *pneumophila*. De fait, cette méthode a été optimisée (température d'incubation et composition des milieux gélosés) pour la

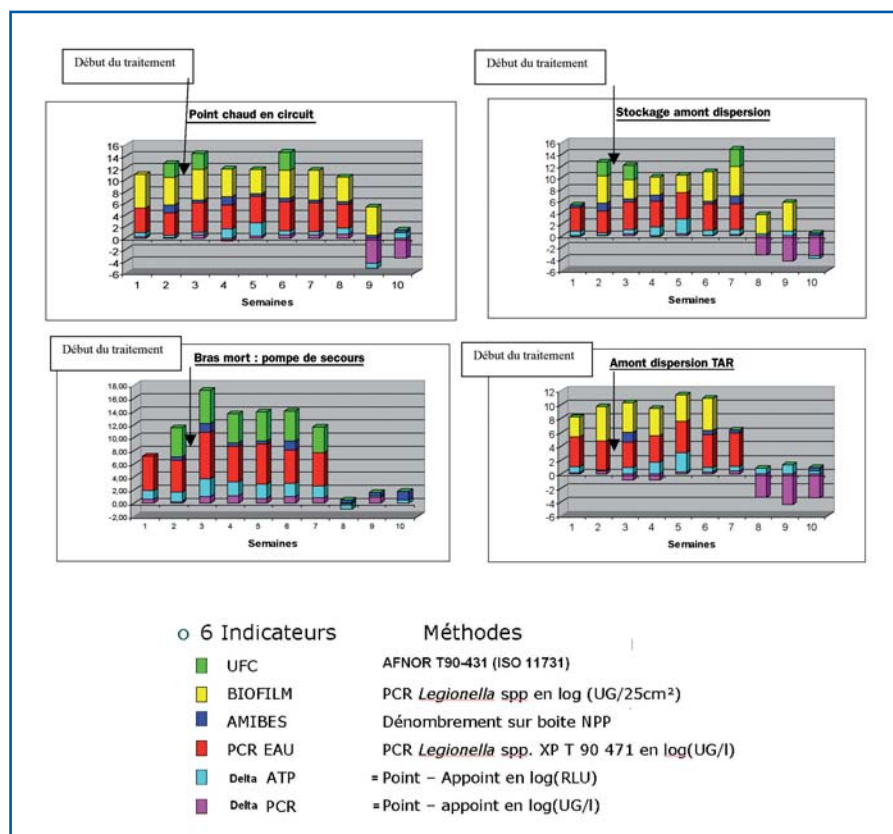
première espèce pathogène isolée et identifiée aux États-Unis, à la fin des années 1970. Du point de vue des réglementations, les TAR sont concernées par une limitation de la concentration en *Legionella spp.*, toutes espèces confondues, alors que la réglementation ECS concerne uniquement *L. pneumophila*.

Dans tous les cas, les réglementations sont relatives à la méthode de référence qui dénombre les bactéries cultivables (Unité Formant Colonies) à 36 +/- 2 °C sur les milieux spécifiés de la norme après un délai d'incubation de 8 à 10 jours. De ce fait, 95 % des échantillons positifs sont positifs à *L. pneumophila*.

Les légionelles viables (ayant un potentiel de culture dans l'environnement en présence d'amibes ou dans un biofilm) sont présentes dans une installation sous deux formes : viable cultivable (VC) et viable non cultivable (VBNC). Les techniques de mesures ayant recours à la PCR s'adressent à la somme des deux (VC + VBNC exprimés en Unité génome/l). La réglementation en matière de TAR est basée uniquement sur la fraction cultivable (VC exprimé en Unité Formant Colonie/l).

Une centrale thermo-réfrigérante est un réacteur biologique complexe, non uniformément mélangé, dans lequel le ratio VC/(VC+VBNC) peut varier de 0 à 100 %. Il est donc rigoureusement impossible de prédire un résultat en Unité Formant Colonie à partir d'un résultat PCR exprimé en Unité Génome.

Seul un résultat négatif en PCR est prédictif d'un résultat négatif en culture (si VC+VBNC = 0, alors VC = 0). Un très large consensus existe dans la communauté scientifique sur ce point. L'ensemble des études scientifiques publiées à ce jour montre une absence de corrélation stricte



L'évaluation chronique se fait sur quatre points du circuit représentés respectivement par les quatre graphiques.

Fiche de synthèse "Outils de mesure" adaptés à la surveillance du risque *Legionella* sur tour aéroréfrigérante

Technique analytique	Unité de mesure	Interprétation	Description et commentaire de l'analyse	Outil/offre technique BIO-RAD
Dénombrement des <i>Legionella</i> spp et pneumophila dans l'eau par méthode PCR	Unité Génome par litre (UG/l)	Dénombrement des <i>Legionella</i> totales quel que soit leur état physiologique, y compris celles hébergées par les protozoaires	Cette technique comporte quatre phases : - concentration des bactéries par filtration de l'échantillon d'eau (en général 1litre) sur membrane polycarbonate de porosité 0,45µm. - lyse des bactéries par chocs mécaniques et thermiques pour libérer l'ADN bactérien, c'est l' extraction . - purification de l'extrait sur colonne d'ultrafiltration. - l'ADN contenu dans l'extrait subit une réaction d' amplification et devient quantifiable par détection d'une sonde spécifique fluorescente.	Aquadion™ Kit IQ-Check™ Quanti <i>Legionella</i> spp. et <i>Legionella pneumophila</i>
Dénombrement des <i>Legionella</i> spp dans le biofilm par méthode PCR (Tech. Note BIO-RAD 16995)	Unité Génome par 25cm ² (UG/25cm ²)	Dénombrement des <i>Legionella</i> totales hébergées par le biofilm	Le prélèvement du biofilm est réalisé par écouvillonnage d'une surface de 25 cm ² . L'échantillon prélevé est traité de la même façon que l'eau : extraction, purification et amplification.	Aquadion™ Kit IQ-Check™ Quanti <i>Legionella</i> spp. et <i>Legionella pneumophila</i>
Dénombrement des <i>Legionella</i> spp liées dans l'eau par méthode PCR	Unité Génome par litre (UG/l)	Dénombrement des <i>Legionella</i> présentes dans des protozoaires ou liées à des matières en suspension (biofilm détaché...)	Le protocole d'analyse est identique à ce lui du dénombrement des <i>Legionella</i> libres dans l'eau. La filtration, cependant, est réalisée sur une membrane de porosité supérieure à 0,45µm. Les <i>Legionella</i> libres ne sont pas retenues. A l'inverse les morceaux de biofilm et les amibes sont retenues.	Aquadion™ Kit IQ-Check™ Quanti <i>Legionella</i> spp. et <i>Legionella pneumophila</i>
Dénombrement des amibes dans l'eau (Tech. Note BIO-RAD en cours de rédaction)	Nombre d'amibes par litre (/l)	Recherche et dénombrement des amibes libres dans un échantillon d'eau	Le protocole de recherche d'amibes libres dans l'eau débute par une filtration d'un litre d'échantillon sur membrane de porosité 0,45µm (rétention des particules et des protozoaires). Le dénombrement est réalisé par dilution NPP sur boîte de pétri nappée d' <i>Escherichia coli</i> après 10 jours à 37°C.	
Mesure de l'ATP (Adénosine Triphosphate) dans l'eau.	Unité de Lumière Relative (Log RLU)	Evaluation de la charge microbiologique de l'eau analysée	L'ATP est un intermédiaire énergétique majeur et obligatoire de très nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. C'est la rupture des liaisons entre les différents groupes phosphate qui est responsable de la libération d'énergie. Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP. Ce coenzyme est donc spécifique des milieux vivants. On considérera que toute trace d'ATP est le témoin d'une trace de vie (cellules vivantes ou ayant vécu, car l'ATP n'est pas détruit en totalité à la mort de la cellule).	
Dénombrement des <i>Legionella</i> spp et pneumophila dans l'air (Tech. Note BIO-RAD 16186)	Unité Génome par litre (UG/m ³)	Prélèvement des <i>Legionella</i> totales, quel que soit leur état physiologique, dans l'air	Il permet d'effectuer un prélèvement d'air et de piéger les aéro-biocontaminants sur un liquide. La contamination de l'air en <i>Legionella</i> pourra être évaluée grâce à une analyse du liquide de piégeage.	CIP10-M Biocollecteur Aquadion™ Kit IQ-Check™ Quanti <i>Legionella</i> spp. et <i>Legionella pneumophila</i>

entre UFC et Unité génome.

Un étalonnage "installation TAR dépendant" n'a pas de sens dans la mesure où le ratio VC/VC+VBNC est une fonction variable dans le temps.

Méthode de surveillance optimisée en matière de gestion du risque *Legionella* sur tour aéroréfrigérante

Cette méthodologie a été mise au point, testée, validée sur des installations de refroidis-

sement dans le cadre d'une action collective rassemblant des professionnels de l'agroalimentaire, des laboratoires de recherche publique, des équipementiers et des traiteurs d'eau, et soutenue financièrement par la DRIRE LR et la région Languedoc-Roussillon.

Elle comprend le contrôle réglementaire (arrêté décembre 2004 rubrique 2921), un diagnostic évaluation et un Plan de surveillance détaillé en tableaux ci-joints, avec des outils de mesure microbiologiques adap-

tés. Les informations recueillies sont exploitées corrélativement avec l'hydraulicité de l'installation, la qualité de l'eau du circuit, les caractéristiques du traitement appliqué (biocide, biodispersant, traitement physique...).

Le diagnostic d'évaluation

Le diagnostic d'évaluation a pour objectif d'estimer le risque réel de développement des *Legionella* en tenant compte de son écologie. Pour cela, l'évaluation de l'efficacité du traitement de l'eau des TAR doit être

Le plan de surveillance

Type de tours aéroréfrigérantes concernées	Éléments d'information	Phénomènes biologiques observés	Objectifs visés
TAR ouvertes	Diagnostic précité	Cultivabilité des Legionelles Présence de biofilms Présence d'amibes	Comprendre les évolutions observées pendant la surveillance
TAR fermées		Comportement de l'installation vis-à-vis de l'augmentation des populations de la flore totale et des Legionelles	Réduire le signal PCR ainsi que sa variation dans le temps
TAR soumises à autorisation ou déclaration	PCR <i>Legionella</i> sur eau en amont dispersion ATP total sur eau en amont dispersion Contrôle réglementaire XP T90-471	Dénombrement <i>Legionella</i> totale Evaluation de la biomasse planctonique Cultivabilité des bactéries	Alerte sur un accroissement significatif de la biomasse Déclaration de conformité

Le plan de surveillance résulte de la mesure d'indicateurs biologiques et physico-chimiques, selon une fréquence variable prédéfinie. Ces indicateurs sont prédictifs des dérives du réacteur biologique. Le plan de surveillance utilise les données du contrôle réglementaire, des diagnostics d'évaluations auxquels s'ajoutent les mesures PCR et ATP à cadence plus élevées



noter que les échelles sont différentes, Les barres en verts qui montrent la cultivabilité des légionelles sont inexistantes au point chaud en circuit, alors qu'elles sont toujours présentes pendant 6 semaines sur le point bras mort : pompe de

Kits IQ-Check Legionella™ correspondant aux exigences de la norme Afnor XP T 90- 471 pour la détection et la quantification des légionelles dans l'eau, l'air et les biofilms.

faite selon quatre points :

- ▶ Détermination de la biomasse du biofilm et des populations de légionelles,
- ▶ Dénombrement et identification des Amibes,
- ▶ Analyse quantitative par PCR et par milieu de culture des légionelles planctoniques,
- ▶ Analyse par ATPmétrie de la flore totale active qui est un bon indicateur du niveau de contamination.
- ▶ Analyse quantitative par PCR des légionelles contenues dans les aérosols.

Exemple du déroulement d'une étude évaluant l'efficacité des traitements sur les installations de tours aérorefrigérantes

Caractéristiques de l'installation : forage privé, fonctionnement sans arrêt, volume circuit 1.500 m³ et TAR ouverte.

L'étude a été menée sur trois mois. Dix prélèvements ont été réalisés dont deux avant le début du traitement en guise de diagnostic microbiologique de départ.

L'évaluation chronique se fait sur quatre points du circuit (point chaud en circuit, stockage amont dispersion, bras mort : pompe de secours et en amont de la dispersion de la TAR) représentés respectivement par les quatre graphiques (cf figure 1).

Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes empilés. Trois indicateurs sur six font appel à la technique PCR. Il faut

secours et aléatoirement présentes sur les deux autres points. Le biofilm représenté en jaune ne réagit qu'après plusieurs semaines de traitement. Il est relativement stable jusqu'à sa disparition.

Interprétation des résultats (I)

- L'approvisionnement en eau d'une TAR n'est pas neutre dans la contamination de son circuit.

La mesure calculée du delta PCR (= valeur PCR Point chaud en circuit – la valeur de l'appoint en log (UG/L)), permet d'estimer la prolifération ou la réduction de la population *Legionella*.

Cela signifie que l'installation n'est pas la source de légionelles. C'est l'eau d'appoint qui amène la majeure partie des légionelles dans le circuit. Ces résultats nous ont amenés à préconiser un traitement de l'eau d'appoint.

- Le contrôle réglementaire est opéré au point Amont dispersion. Il est basé sur le dénombrement des bactéries *Legionella* cultivables associé au risque de santé publique. La cultivabilité des légionelles est une caractéristique variable et temporaire et peu homogène sur les différents points de l'installation.

Conclusion

L'expérience acquise sur de nombreuses installations montre l'intérêt de surveiller la

qualité microbiologique de l'eau d'appoint, qui fluctue en fonction des ressources captées (forage, adduction potable, adduction eau de surface), et du temps (influence des mélanges, des épisodes pluvieux).

Les différentes techniques de biologie moléculaire utilisées (eaux, biofilm, air) développées dans le cadre de l'action collective: Innovation Transfert de Technologie n° 2 "Surveillance complexe de l'écosystème microbien d'une TAR – Élaboration d'une méthodologie originale en routine de suivi de la qualité et prévention des risques" avec l'appui de la recherche publique permettent aujourd'hui d'appréhender la dynamique des populations microbiologiques au sein du réacteur TAR.

Combiné aux investigations classiques, cette méthodologie autorise un monitoring "temps réel" de l'évolution du risque *Legionella* dans la TAR. La microbiologie doit être examinée d'un point de vue dynamique et non pas statique avec des outils rapides et si possible à haut débit.

Ces outils ne se substituent pas à la méthode de référence réglementaire (NF T90-431), ni aux autres mesures/enregistrements (hydraulique, physico-chimie, microbiologie sur gélose) mais les complètent efficacement.

Outil de mesure spécifique normalisé (XP T90-471), la PCR réclame néanmoins l'intervention de laboratoires "experts" capables de déterminer les points de prélèvement et surtout d'interpréter les résultats dans l'espace et dans le temps en perspective avec les autres indicateurs biologiques et physico-chimiques suivis sur l'installation.

Les outils proposés par Bio-Rad pour l'évaluation de l'efficacité d'un traitement, font partie d'un programme mis en place par cette société à l'échelle européenne, qui procure également un appui technique appréciable.

Outil rapide de quantification, la PCR permet également de faire des bilans microbiologiques entrée/sortie d'un équipement particulier, d'une portion de circuit et d'en déduire des informations pertinentes en matière de conduites des installations.

Le gain économique engendré s'apprécie ici à la fois en termes d'optimisation des traitements, de sécurisation du fonctionnement de l'installation et diminution des impacts sur l'environnement (air, eaux résiduaires). ■