



MODE OPERATOIRE DU KIT **DENDRIDIAG® SW**

Quantification de la flore totale d'une eau sanitaire par ATP-métrie

- LUMINOMÈTRE KIKKOMAN PD30 -

SOMMAIRE

GL BIOCONTROL	page 3
Qu'est-ce que l'ATP-métrie ?	page 4
L'ATP-métrie de GL BIOCONTROL	page 5
Matériel nécessaire	page 6
Protocole	page 7
Interprétation des résultats	page 10
Gestion des anomalies	page 12
Contrôles	page 14
Contact	page 15

GL BIOCONTROL

La société GL BIOCONTROL est spécialisée dans la maîtrise des risques environnementaux.

Nos clients sont des professionnels de l'environnement : industriels, exploitants, sociétés de maintenance, traiteurs d'eau, laboratoires, bureaux d'études et collectivités publiques.

Nous sommes organisés autour de 5 activités : les études, la recherche & développement, les analyses, les produits et les formations. À travers ces domaines d'activité, GL BIOCONTROL :

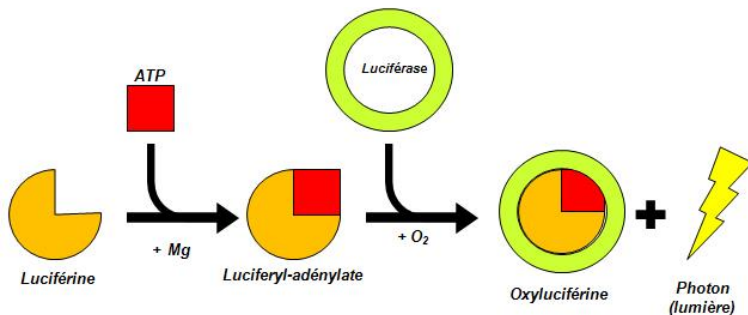
- **Développe** des outils de surveillance du risque microbiologique (mesures par ATP-métrie permettant de quantifier la flore totale présente dans les eaux et sur les surfaces).
- **Utilise** des méthodologies et les outils modernes de la biologie pour étudier le monde microbien (qPCR, NGS, ATP-métrie...).
- **Étudie** les écosystèmes de l'environnement pour anticiper et prévenir les risques sanitaires liés en particulier aux genres *Legionella* et *Pseudomonas* (analyse méthodique des risques, diagnostic microbiologique, cartographie ATP...).
- **Conseille** les acteurs de « la filière eau » dans la conduite de leurs installations pour réduire le risque sanitaire et l'empreinte environnementale (biosurveillance des circuits, pack de surveillance, évaluation de l'efficacité des procédés et des procédures de traitement...).
- **Forme** les professionnels de l'environnement sur la gestion des risques microbiologiques et sur les techniques de laboratoire.

Qu'est-ce que l'ATP-métrie ?

L'**adénosine triphosphate** (ATP) est l'intermédiaire énergétique majeur et obligatoire de très nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP. Ce coenzyme est **spécifique des milieux vivants**, on considérera que toute trace d'ATP est le témoin d'une trace de vie.

Dans l'eau, quantifier l'ATP présent à l'intérieur des cellules revient à **quantifier les microorganismes totaux** (flore totale ou biomasse totale).

L'**ATP-métrie** est une technique de mesure basée sur le principe de la **bioluminescence**. La lumière émise par une **réaction enzymatique** utilisant la luciférine et la luciférase de luciole est mesurée :



L'ATP, en présence d'un complexe Luciférine/Luciférase et d'un catalyseur, libère de l'énergie sous forme de **lumière**. En mesurant la quantité de lumière émise à l'aide d'un **luminomètre**, on en déduit la **quantité d'ATP en picogramme par millilitre**. La flore totale, exprimée en **équivalent bactéries par millilitre**, est calculée à partir de la relation suivante : 1 picogramme \approx 1 000 bactéries.

La méthode de mesure de la flore totale par ATP-métrie est un **test de terrain** dont le résultat est obtenu en quelques minutes.

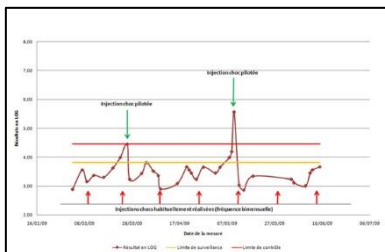
L'ATP-métrie de GL BIOCONTROL

L'ATP-métrie de GL BIOCONTROL vous permettra :



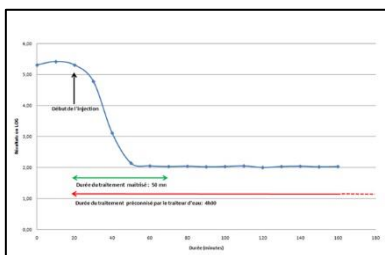
D'anticiper les dérives de votre installation :

- Maitriser l'encrassement biologique.
- Gérer les risques pour la santé publique.
- Éviter les arrêts de production.
- Optimiser la stratégie de traitement.



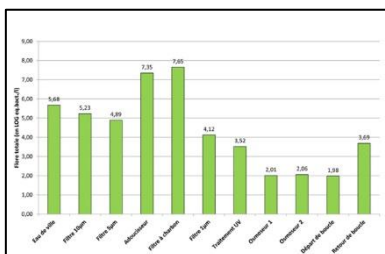
De piloter l'injection des produits biocides :

- Adapter la stratégie de traitement.
- Réduire jusqu'à 40% les coûts de traitement.
- Améliorer l'impact environnemental.
- Limiter la corrosion.



D'évaluer l'efficacité de vos procédures de traitement :

- Valider les différentes phases :
 - Nettoyage (biodispersant),
 - Vidange ou rinçage,
 - Désinfection (biocide).
- Réduire le temps de mobilisation des hommes et le temps d'arrêt de l'installation.



D'identifier les zones propices au développement :

- Caractériser les points critiques du circuit d'eau en temps réel.
- Détecter un élément de réseau produisant de la biomasse.
- Identifier le dysfonctionnement d'un élément de réseau.

Matériel nécessaire

Kit de réactifs pour 60 mesures

Produit	Quantité
Flacon compte-gouttes DENDRIDIAG® SW *	6
Flacon compte-gouttes STANDARD 1000 *	1

Kit de consommables pour 60 mesures

Produit	Quantité
Flacon de prélèvement 60ml stérile	60
Seringue stérile de 50ml ou 10ml	60
Filtre stérile de porosité 0,45µm	60
Tube en polypropylène stérile	60

Equipements

Produit	Quantité
Luminomètre KIKKOMAN PD30 ou équivalent	1
Porte-tube compatible PD30	1

** Les flacons compte-gouttes doivent être stockés au congélateur (env. -18°C) et à l'abri de la lumière. Ils peuvent être conservés 12 mois a minima. Suite à leur première utilisation, ces réactifs seront préférentiellement recongelés, ou à défaut conservés au réfrigérateur (3 - 8°C) et à l'abri de la lumière jusqu'à 8 semaines.*

Protocole

Prélèvement



Selon les bonnes pratiques, flamber le point de prélèvement ou le nettoyer à l'aide d'une lingette. Purger le point de prélèvement pendant 30 secondes minimum pour les eaux froides et jusqu'à obtenir une température stable dans le cas des eaux chaudes.

Placer le flacon sous le flux d'eau sans modifier le débit d'écoulement. Une fois plein, retirer le flacon du flux d'eau puis stopper l'écoulement.

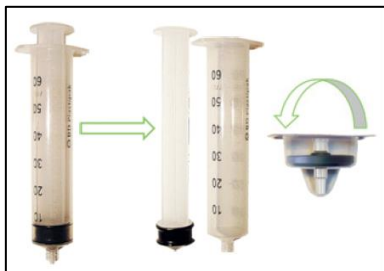
Installation



Décongeler un flacon de chaque réactif (**DENDRIDIAG® SW** et **STANDARD 1000**). Les laisser revenir à température ambiante (supérieure à 18°C).

Préparer les consommables plastiques (flacon, seringue, filtre et tube). Allumer le luminomètre et attendre 10 secondes la fin de la calibration de l'appareil.

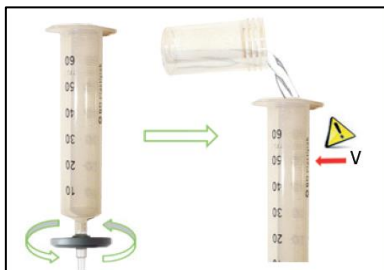
Filtration de l'échantillon



Sortir la seringue de son emballage.

Retirer le piston et le déposer en prenant garde de ne pas toucher l'extrémité noire avec la main ou le plan de travail.

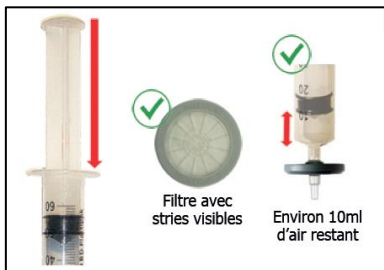
Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage.



Visser fermement la seringue sur le filtre pour assurer l'étanchéité.

Verser le contenu du flacon d'eau prélevée dans le corps de seringue.

 **Noter le volume d'eau filtré.**




Replacer le piston dans la seringue.

Filtrer la totalité de l'échantillon jusqu'à ce que les stries du filtre soient à nouveau visibles.

Stopper alors la pression.


Ne pas faire descendre le piston jusqu'au fond de la seringue pour ne pas sécher le filtre.

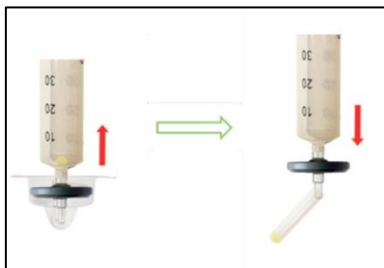
Mesure

 **S'assurer que le réactif soit proche de la température ambiante (>18°C).
Chauffer entre vos mains si nécessaire.**



Déposer 4 gouttes de DENDRIDIAG® SW au fond de la cupule plastique du filtre.

 **A partir de cette étape, aucun temps de pause n'est permis.**



Placer la pointe du filtre dans le fond de la cupule, aspirer en une seule fois la totalité du DENDRIDIAG® SW et maintenir la dépression.

Par une pression sur le piston de la seringue (progressive au début puis forte et constante à la fin), repousser le réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche.



Stopper dès que la mousse apparait dans le tube. La photo ci-contre montre l'aspect que doit avoir le réactif dans le tube de mesure.

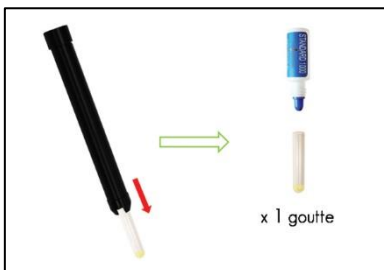
Une pression trop forte ou longue crée une mousse intermédiaire entre le réactif et le haut du tube de mesure (à éviter afin que le **STANDARD 1000** se mélange correctement).



Fixer le tube au porte-tube compatible PD30.

Placer l'ensemble dans le luminomètre et appuyer sur « Enter » pour lancer la mesure.

Noter le résultat R1 (en RLU).



Immédiatement, sortir l'ensemble (porte-tube & tube) du luminomètre.

Décrocher le tube et introduire au centre une goutte de **STANDARD 1000** (ajout dosé).



Fixer le tube au porte-tube compatible PD30 et homogénéiser correctement.

⚠ Dans le cas où la mousse formerait une barrière en haut du tube, tapoter le tube sur une surface plane.

Replacer l'ensemble dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur « Enter ».

Noter le résultat R2 (en RLU).

Interprétation des résultats

La date de la mesure ou le point prélevé, le volume filtré ainsi que les valeurs R1 et R2 mesurées par le luminomètre, doivent être rentrés dans le fichier Excel fourni.

TABLEAU DE CALCUL DES VALEURS DE FLORE TOTALE D'UNE EAU PAR ATP-METRIE (en pgATP/ml ou eq.bact./ml)										
MODE BIOSURVEILLANCE										
Date de prélèvement	Volume filtré (en ml)	Valeur R1 (en RL.U)	Valeur R2 (en RL.U)	Résultats de la mesure			Commentaires et suggestions pour améliorer l'analyse Pour plus d'informations, voir la feuille "Gestion des anomalies"	Commentaire utilisateur		
				Quantité d'ATP (en pgATP/ml)	Flore totale (en eq.bact./ml)					

Les **calculs** se font automatiquement et sont donnés en :

- **picogramme** par millilitre (pg ATP/ml),
- flore totale en **équivalent bactérie** par millilitre (eq.bact./ml),
- flore totale en **logarithme** par millilitre (LOG eq.bact./ml).

Dans le cas où vous effectuez un **suivi de votre réseau dans le temps**, remplissez la feuille « BIOSURVEILLANCE ». Un graphique se trace automatiquement dans l'onglet « GRAPH BIOSURVEILLANCE ».

⇒ *Il est conseillé de réaliser a minima un suivi hebdomadaire de la qualité de l'eau.*

Dans le cas où vous effectuez une **cartographie de votre réseau**, remplissez la feuille « CARTOGRAPHIE ». Un graphique se trace automatiquement dans l'onglet « GRAPH CARTOGRAPHIE ».

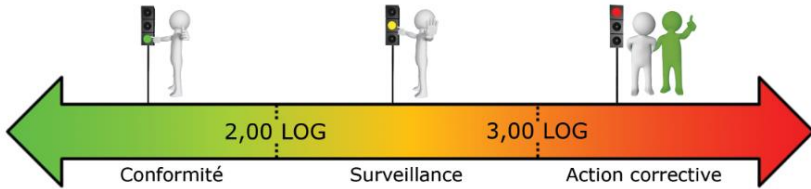
⇒ *Il est conseillé de réaliser une mesure en amont et en aval de chaque élément important du réseau.*



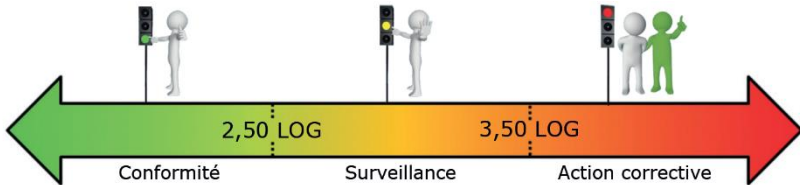
Deux résultats sont considérés comme significativement différents si le delta est d'au moins 1,00 LOG.

Des limites de surveillance et de contrôle ont été établies à partir de notre expérience des réseaux d'eau. Ces seuils sont à affiner en fonction des premiers résultats obtenus sur vos circuits. Les flèches suivantes vous aideront à **interpréter vos résultats** :

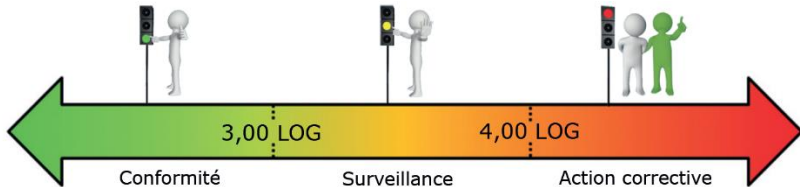
Réseau de production d'eau potable - Sortie filière (en LOG eq.bact./ml) :



Réseau de distribution d'eau potable (en LOG eq.bact./ml) :



Réseau d'eau chaude sanitaire (en LOG eq.bact./ml) :



On considère que lorsqu'une mesure est :

- **Sous le seuil de surveillance**, l'installation est sous contrôle microbiologique,
- **Entre le seuil de surveillance et le seuil de contrôle**, l'installation ne présente pas de danger immédiat. Une action corrective est recommandée si 3 mesures consécutives se situent dans cette zone,
- **Supérieure au seuil de contrôle**, l'installation n'est pas sous contrôle microbiologique. Une action corrective rapide est recommandée.

Dans le fichier Excel, le résultat est affiché en vert, orange ou rouge selon s'il se trouve sous le seuil de surveillance, entre le seuil de surveillance et de contrôle ou au-dessus du seuil de contrôle.

Gestion des anomalies

Problème rencontré	Commentaires et suggestions
Affichage « Faible sensibilité des réactifs. Augmentez le volume filtré. » dans le tableur Excel.	<p>Le réactif DENDRIDIAG® SW n'est pas suffisamment actif (périmé, dégradé ou trop froid) pour obtenir une bonne sensibilité.</p> <p>Réchauffer le réactif à une température supérieure à 18°C et recommencer la manipulation. Si le problème persiste, effectuer un Contrôle de l'efficacité des réactifs (cf. page 14).</p>
Affichage « Contrôlez le mélange du Standard, la température et l'état des réactifs. » dans le tableur Excel.	<p>L'ajout dosé ne s'est pas effectué correctement. Tapoter le tube sur une surface plane, homogénéiser et relancer la mesure. Si le problème persiste :</p> <ul style="list-style-type: none">- Le réactif DENDRIDIAG® SW n'est pas actif (périmé, dégradé ou froid). Réchauffer le réactif et effectuer un Contrôle de l'efficacité des réactifs (cf. page 14).- L'échantillon a un effet inhibiteur. Recommencer la mesure en rinçant la membrane avec de l'eau stérile ou une solution spécifique après filtration de l'échantillon (consulter GL BIOCONTROL).
Affichage « Echantillon fortement contaminé. Si nécessaire, réduisez le volume filtré. » dans le tableur Excel.	<p>La concentration en ATP dans l'échantillon est trop élevée. Recommencer la manipulation en choisissant un volume de filtration plus faible (1/10ème environ).</p>

- Difficulté à obtenir la mousse.** Utiliser la paume de la main pour appuyer sur le piston et maintenir la pression quelques secondes. Si le problème persiste, utiliser une seringue de 10 ml ou demander conseil à GL BIOCONTROL.
- Trop de mousse dans le tube.** Incliner le tube pour faire couler le réactif le long de la paroi et stopper la pression dès l'apparition de la mousse. Bien homogénéiser le tube après l'ajout du **STANDARD 1000** en tapotant la base sur une surface plane.
- Peu de réactif ressort de la seringue.** Vous avez certainement séché le filtre. Recommencer la manipulation en veillant à ne pas sécher le filtre lors de l'étape de filtration. Stopper la pression sur la seringue lorsque vous sentez une résistance.
- Colmatage du filtre.** Le filtre peut se colmater si l'eau est fortement chargée en bactérie.
- Si vous êtes parvenu à filtrer au moins 10% de l'échantillon : notez le volume filtré, dévissez le filtre et vider la seringue. Remplacez le piston en laissant une garde d'air de 10 ml. Revissez le filtre et continuez le protocole classique.
 - Si vous ne parvenez pas à filtrer : diluez votre échantillon en ne versant que 5 ml dans la seringue et en complétant jusqu'à 50 ml avec de l'eau stérile (consulter GL BIOCONTROL).

Contrôles

Contrôle de la contamination de l'appareil

- Fixer un tube de mesure vide au porte-tube compatible PD30,
- Introduire l'ensemble dans le luminomètre et appuyer sur le bouton « Enter »,
- Le résultat doit être inférieur ou égal à 2 RLU. Sinon, à l'aide d'un écouvillon en coton, nettoyer les surfaces internes de la chambre de mesure (réceptacle au porte-tube).

Contrôle de la contamination du réactif

- Dans un tube, déposer 2 gouttes de DENDRIDIAG® SW,
- Fixer le tube au porte-tube compatible PD30,
- Introduire l'ensemble dans le luminomètre et appuyer sur le bouton « Enter »,
- Le résultat doit être inférieur à 5 RLU. Sinon, éliminer le réactif contaminé et choisir un nouveau flacon de DENDRIDIAG® SW.

Contrôle de l'efficacité des réactifs

- Dans un tube, déposer 2 gouttes de réactif DENDRIDIAG® SW et 1 goutte de STANDARD 1000 (la température des réactifs doit être supérieure à 18°C),
- Fixer le tube au porte-tube compatible PD30,
- Homogénéiser en tapotant le fond du tube sur une surface plane,
- Introduire l'ensemble dans le luminomètre et appuyer sur le bouton « Enter »,
- Pour une bonne efficacité des réactifs, le résultat affiché doit être supérieur à 200 RLU. Sinon, éliminer le réactif qui ne présente pas une efficacité optimale et choisir un nouveau flacon de DENDRIDIAG® SW.

Contact

Pour toute aide ou informations complémentaires sur l'interprétation des résultats, le protocole de mesure ou pour des informations commerciales, contacter par mail ou téléphone :

Yannick FOURNIER

Ingénieur Commercial

9, avenue de l'Europe - Cap Alpha

34 830 CLAPIERS (FRANCE)

GSM : +33 (0)6 33 64 42 29

Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20

Email : y.fournier@gl-biocontrol.com

Célia FRANCOIS

Ingénieur d'études sanitaires

9, avenue de l'Europe - Cap Alpha

34 830 CLAPIERS (FRANCE)

Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20

Fax : +33 (0)9 55 25 40 31

Email : c.francois@gl-biocontrol.com

Un tutoriel vidéo du protocole de test est disponible dans la clé USB livrée avec l'appareil de mesure ou sur notre site internet dans l'onglet Produits – Kit d'ATP-métrie pour eau sanitaire :

www.gl-biocontrol.com

En complément du fichier Excel, l'application web **DENDRIDIAG® SOFTWARE** est disponible sur smartphone et tablette à l'adresse suivante :

<https://dendridiag.gl-biocontrol.com>

4 façons de commander facilement

@ par email à contact@gl-biocontrol.com,

☎ par fax au + 33 (0)9 55 25 40 31,

☎ par téléphone au + 33 (0)9 67 39 35 20,

✉ par courrier à GL BIOCONTROL - 9, avenue de l'Europe, Cap Alpha - 34 830 CLAPIERS (FRANCE).

>>> www.gl-biocontrol.com



9, avenue de l'Europe - Cap Alpha

34 830 CLAPIERS (FRANCE)

Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20

Email : contact@gl-biocontrol.com

Web : www.gl-biocontrol.com