



MODE OPERATOIRE DU KIT DENDRIDIAG® UPW

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

- LUMINOMÈTRE KIKKOMAN C110 -

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 d'analyse à partir d'un flacon ou d'une cuve	page 7
Protocole d'analyse à partir d'une vanne PEMS	page 10
Interprétation des résultats	page 13
Gestion des anomalies	page 16
Contrôles	page 18
Contact	page 19

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 :

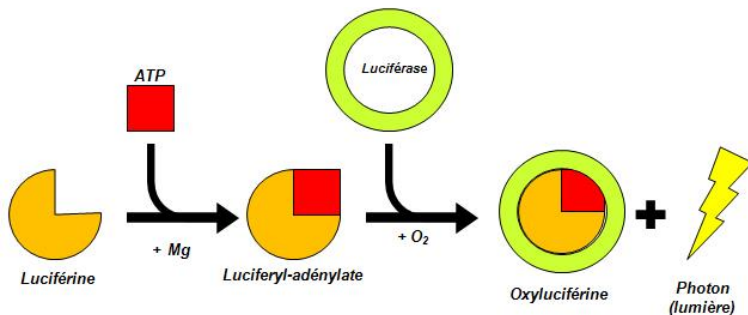
- **Développe** des outils de surveillance du risque microbiologique (mesures par ATP-métrie permettant de quantifier la flore totale présente dans les eaux et sur les surfaces).
- **Utilise** des méthodologies et les outils modernes de la biologie pour étudier le monde microbien (qPCR, NGS, ATP-métrie...).
- **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...).

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 :

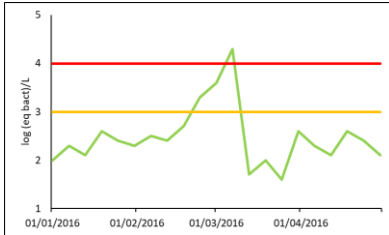


L'ATP, en présence d'un complexe Luciférine/Luciférase et d'un catalyseur, libère de l'énergie sous forme de **lumière**. En mesurant la quantité de lumière émise à l'aide d'un **luminomètre**, on en déduit la **quantité d'ATP en picogramme par millilitre**. La flore totale, exprimée en **équivalent 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

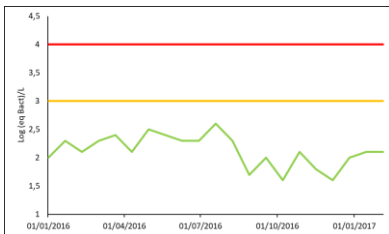
L'ATP-métrie de GL BIOCONTROL vous permettra :



Gérer l'encrassement de vos membranes

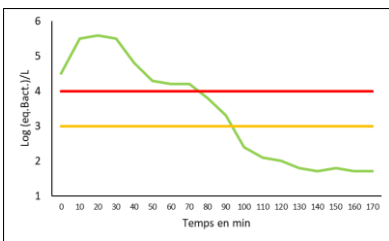
d'osmose :

- Anticiper l'encrassement biologique.
- Gérer les risques pour la santé publique (dialyse).
- Éviter les arrêts de production.



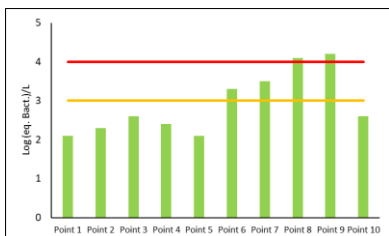
Surveiller votre réseau :

- Déclencher les traitements seulement quand nécessaire.
- Réduire les défauts de production.
- Réduire les coûts d'arrêt d'installation.



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® UPW *	6
Flacon compte-gouttes STANDARD 1000 *	1

Kit de consommables pour 60 mesures à partir d'un flacon ou cuve

Produit	Quantité
Seringue stérile de 10ml	60
Filtre de porosité 0,45µm stérile	60
Prolongateur luer-lock stérile	60
Pipette d'aspiration stérile 1 ml	60
Tube en polypropylène stérile	60

Kit de consommables pour 60 mesures à partir d'une vanne PEMS

Produit	Quantité
Seringue stérile de 10ml	60
Filtre de porosité 0,45µm stérile	60
Adaptateur luer-lock / PEMS stérile	60
Tube en polypropylène stérile	60

Equipements

Produit	Quantité
Luminomètre KIKKOMAN C110 ou équivalent	1
Pompe de filtration électronique (uniquement pour le prélèvement à partir d'un flacon ou d'un bac)	1
Hotte à flux laminaire	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 à 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 d'analyse : à partir d'un flacon ou d'une cuve

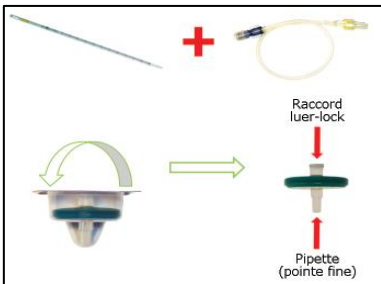
Installation



Sous la hotte à flux laminaire, décongeler un flacon de chaque réactif (**DENDRIDIAG® UPW** et **STANDARD 1000**). Les laisser revenir à température ambiante (supérieure à 18°C).

Préparer les consommables plastiques (seringue, filtre, prolongateur, pipette et tube). Allumer le luminomètre, chambre de mesure fermée. Sélectionner le menu « *Standard Mode* ».

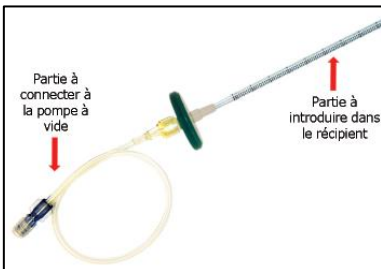
Prélèvement de l'échantillon d'eau



Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage. Ouvrir la pipette du côté de la pointe.

Sortir le prolongateur luer-lock de son emballage en prenant garde de ne pas toucher les extrémités.

Connecter la pipette sur le filtre du côté de la pointe fine. Connecter le prolongateur luer-lock sur le filtre.



Connecter l'autre extrémité du prolongateur luer-lock sur la pompe à vide.

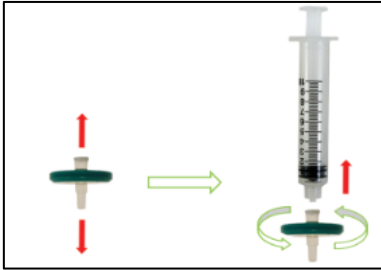
Ouvrir le flacon à analyser, introduire la pipette et aspirer le volume souhaité (environ 1000 ml). Ne pas sécher le filtre pendant l'aspiration.



Noter le volume d'eau filtré.

MODE OPERATOIRE DU KIT DENDRIDIAG® UPW

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



Sortir la seringue de son emballage et aspirer 4 ml d'air.

Déconnecter le filtre du montage en prenant garde de ne pas toucher les extrémités.

Visser le corps de la seringue sur le filtre. Pousser légèrement sur le piston afin d'éliminer le volume mort d'eau présent dans le filtre jusqu'à ce que les stries du filtre soient visibles.

Quantification de la flore totale dans l'échantillon d'eau



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



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

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



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

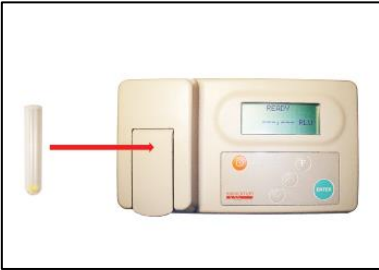


Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser le réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche.

Stopper dès que la mousse apparait dans le tube. 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).

MODE OPERATOIRE DU KIT DENDRIDIAG® UPW

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



Placer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter ».

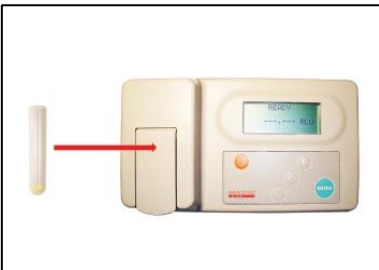
Noter le résultat R1 (en RLU).

Si l'appareil affiche « OVERSCALE », la limite haute de quantification a été dépassée. Stopper le protocole et recommencer en filtrant un volume plus faible (environ 1/10).



Immédiatement, ouvrir le capot et récupérer le tube.

Introduire au centre du tube une goutte de **STANDARD 1000** (ajout dosé).



Homogénéiser correctement le mélange.

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

Replacer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur « Enter ».

Noter le résultat R2 (en RLU).

Protocole d'analyse : à partir d'une vanne PEMS

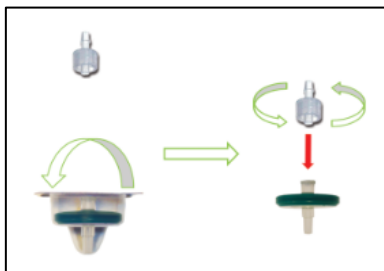
Installation



Sous la hotte à flux laminaire, décongeler un flacon de chaque réactif (**DENDRIDIAG® UPW** et **STANDARD 1000**). Les laisser revenir à température ambiante (supérieure à 18°C).

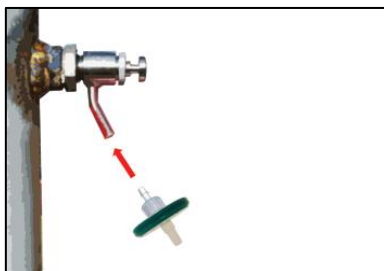
Préparer les consommables plastiques (seringue, filtre, adaptateur luer-lock et tube). Allumer le luminomètre, chambre de mesure fermée. Sélectionner le menu « *Standard Mode* ».

Prélèvement de l'échantillon d'eau



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

Connecter l'adaptateur luer-lock sur le filtre en prenant garde de ne pas toucher l'extrémité des éléments.



Purger le point de puisage pendant 20 secondes puis stopper l'écoulement.

Connecter le montage raccord-filtre sur la vanne.

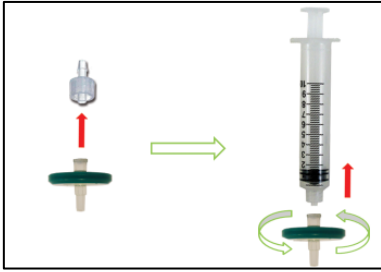
Ouvrir la vanne et filtrer 1000 ml. Placer un flacon poubelle sous le point de prélèvement afin de mesurer le volume d'échantillon filtré.



Noter le volume d'eau filtré.

MODE OPERATOIRE DU KIT DENDRIDIAG® UPW

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



Sortir la seringue de son emballage et aspirer 4 ml d'air.

Retirer le montage de la vanne PEMS II et déconnecter le filtre de l'adaptateur.

Visser le corps de la seringue sur le filtre. Pousser légèrement sur le piston afin d'éliminer le volume mort d'eau présent dans le filtre jusqu'à ce que les stries du filtre soient visibles.

Quantification de la flore totale dans l'échantillon d'eau



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



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

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



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

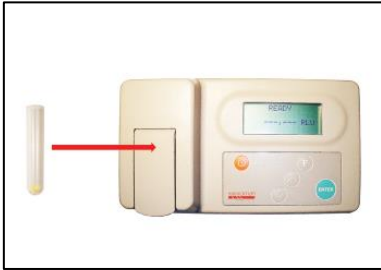


Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser le réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche.

Stopper dès que la mousse apparait dans le tube. 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).

MODE OPERATOIRE DU KIT DENDRIDIAG® UPW

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



Placer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »

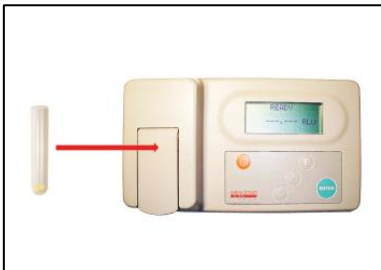
Noter le résultat R1 (en RLU).

Si l'appareil affiche « OVERSCALE », la limite haute de quantification a été dépassée. Stopper le protocole et recommencer en filtrant un volume plus faible (environ 1/10).



Immédiatement, ouvrir le capot et récupérer le tube.

Introduire au centre du tube une goutte de **STANDARD 1000** (ajout dosé).



Homogénéiser correctement le mélange.



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

Replacer le tube dans le luminomètre, refermer le capot et appuyer sur « Enter ».

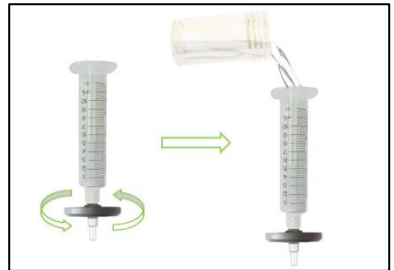
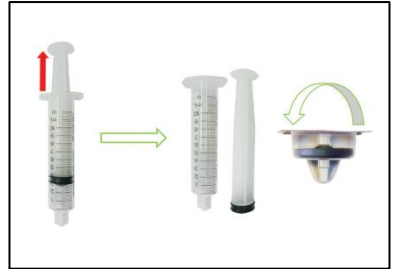
Noter le résultat R2 (en RLU).

Interprétation des résultats

Mesure du blanc méthode (Rbm)

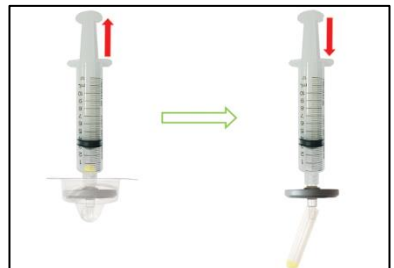
Afin d'avoir une analyse la plus sensible possible, il est nécessaire de soustraire le bruit de fond de la méthode. Pour cela, effectuer une mesure d'ATP sur une eau stérile :

1. Sortir la seringue de son emballage. Retirer le piston et le déposer en prenant garde de ne pas mettre en contact l'extrémité noire et le plan de travail.
2. Ouvrir l'opercule plastique du filtre sans jeter l'emballage.
3. Visser fermement la seringue sur le filtre pour assurer l'étanchéité.
4. Verser le contenu du flacon d'eau stérile dans le corps de seringue.
5. 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.



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

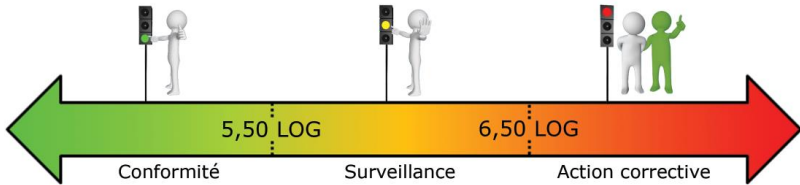
6. Déposer 4 gouttes de réactif DENDRIDIAG® UPW au fond de la cupule.
7. Placer la pointe du filtre dans le fond de la cupule, aspirer en une seule fois la totalité du DENDRIDIAG® UPW et maintenir la dépression.



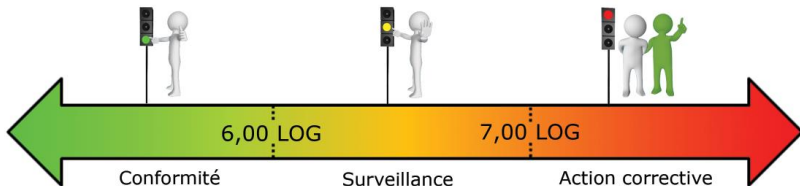
8. Par une pression constante sur le piston de la seringue, repousser le réactif dans le tube jusqu'à l'apparition d'une mousse blanche.
9. Placer le tube dans le luminomètre et appuyer sur « Entrer » pour lancer la mesure.
10. Noter le résultat Rbm (en RLU).

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** :

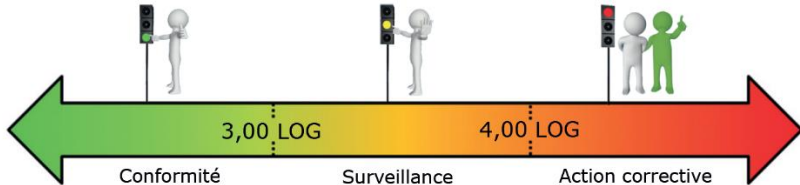
Eau de ville (en LOG eq.bact./l) :



Eau adoucie (en LOG eq.bact./l) :



Eau ultra-pure (en LOG eq.bact./l) :



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. Contrôler le mélange du Standard, la température et l'état des réactifs. » dans le tableur Excel.	<p>Le réactif DENDRIDIAG® UPW 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 <i>Contrôle de l'efficacité des réactifs</i> (cf. page 18).</p>
Affichage « Valeur du blanc trop élevée. Vérifier la qualité microbiologique de l'eau stérile et des consommables. » dans le tableur Excel.	<p>L'eau pour préparation injectable, les consommables ou le réactif DENDRIDIAG® UPW sont contaminés.</p> <p>Effectuer un <i>Contrôle de la contamination du luminomètre</i> et/ou un <i>Contrôle de la contamination des réactifs</i> (cf. page 18).</p> <p>Si le problème persiste, utiliser un flacon d'eau neuf.</p>
Trop de mousse dans le tube.	<p>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.</p>

- 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. Pour cela, stopper la pompe dès que le flacon d'eau ou le bac est vide.
- Je ne parviens pas à filtrer la totalité de mon flacon.** Lors du prélèvement, la pipette est certainement sortie de l'eau, et de l'air a été aspiré. Dans ce cas, le filtre n'est plus perméable à l'eau.
- Si vous avez filtré suffisamment d'eau, notez le volume filtré et continuez la manipulation.
- Si vous n'avez pas filtré suffisamment d'eau, changez le montage de prélèvement (filtre, pipette et prolongateur luer-lock) et recommencez l'analyse.

Contrôles

Contrôle de la contamination de l'appareil

- Introduire un tube de mesure vide dans le luminomètre,
- Refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
- Le résultat doit être inférieur ou égal à 5 RLU. Sinon, à l'aide d'un écouvillon en coton, nettoyer les surfaces internes de la chambre de mesure (réceptacle à tube).

Contrôle de la contamination du réactif

- Dans un tube, déposer 2 gouttes de DENDRIDIAG® UPW,
- Introduire le tube dans le luminomètre,
- Refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
- Le résultat doit être inférieur à 50 RLU. Sinon, éliminer le réactif contaminé et choisir un nouveau flacon de DENDRIDIAG® UPW.

Contrôle de l'efficacité des réactifs

- Dans un tube, déposer 2 gouttes de réactif DENDRIDIAG® UPW et 1 goutte de STANDARD 1000 (la température des réactifs doit être supérieure à 18°C),
- Homogénéiser en tapotant le fond du tube sur une surface plane,
- Introduire le tube dans le luminomètre,
- Refermer le capot et appuyer sur le bouton « Enter »,
- Pour une bonne efficacité des réactifs, le résultat affiché doit être supérieur à 50 000 RLU. Sinon, éliminer le réactif qui ne présente pas une efficacité optimale et choisir un nouveau flacon de DENDRIDIAG® UPW.

Contrôle de l'état de la batterie

Au démarrage de l'appareil, l'affichage présente une ligne « BATTERY ». L'état de charge de la batterie est défini de 1 et 5. Si le test affiche un résultat proche de 1 « BATTERY 1 », veuillez brancher le luminomètre sur le secteur et poursuivre les mesures.

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

Nicolas FABRE

Dirigeant technique

9, avenue de l'Europe - Cap Alpha

34 830 CLAPIERS (FRANCE)

GSM : +33 (0)6 81 71 31 83

Tél. : +33 (0)9 67 39 35 20

Email : n.fabre@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 ultra-pure :

www.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