

Université de Barcelone

Heck Trade S.L.

Etude relative à l'inactivation microbienne
au moyen de l'appareil
AQUA HP-SYSTEME[®]



Barcelone, juillet 2003

Ce rapport correspond au rapport final du travail intitulé „**Etude relative à l'inactivation microbienne au moyen de l'appareil AQUA HP-SYSTEME®**“ qui fait suite à l'accord de collaboration conclu entre l'entreprise Heck Trade, S.L. et les professeurs de l'Institut de microbiologie de l'Université de Barcelone Joan Jofre Torroella et Francisco Gutiérrez.

Ont également participé à la réalisation de la présente étude :

Dr. Xavi Mèndez

Dr. Maite Muniesa,

membres de l'Institut de microbiologie.

Barcelone, juillet 2003

**RAPPORT PRELIMINAIRE DES EXPERIENCES FAITES EN LABORATOIRE
AVEC L'APPAREIL AQUA HP-SYSTEME®**

1. Introduction

Le présent rapport a pour but de définir certaines conditions de base pour la réalisation des essais et expériences préliminaires faits au moyen de l'appareil AQUA HP-SYSTEME® (ci-après : HP-SYSTEM) dont l'objectif est de pouvoir évaluer l'inactivation microbienne lors de son fonctionnement dans un circuit d'eau fermé.

Le mode de fonctionnement de l'appareil est décrit sur le site Web de l'entreprise qui le distribue:

www.crystal-nte.ch

CRYSTAL NTE SA
Av. des Baumettes 9
1020 Renens - Switzerland

La technologie :

La pièce qui est au cœur du développement AQUA HP-SYSTEME® est un hydroréacteur à haut rendement dont le principe de fonctionnement est d'utiliser les forces de l'eau et le potentiel d'oxydation de l'oxygène dissout dans l'eau.

Alimenté par de l'eau fournie par une pompe dont la pression opérationnelle se situe entre env. 5 à 8 bars (72,5 116.00 psi), le réacteur crée de très fortes sur/sous-pressions internes d'eau ainsi que de puissantes forces de friction centrifuges et centripètes. Simultanément l'oxygène dissout dans l'eau est libéré.

Les conditions de sur/sous-pression et la création de forces de friction ont une magnitude de plusieurs milliers de G qui détruisent les bactéries, les spores d'algues et de champignons, les germes et les autres substances organiques contenues dans l'eau.

Lors d'une seconde phase du traitement, et en raison des conditions de sous-pression, l'oxygène ambiant est aspiré dans l'hydroréacteur et est intégré au processus de traitement. La présence d'oxygène libéré par l'eau, ainsi que les 21% d'oxygène ambiant ajouté agissent dans un processus naturel d'oxydation (combustion froide).

La combinaison de sur/sous-pressions, les énormes forces de friction ainsi que le processus naturel d'oxydation au sein du réacteur élimine toutes les impuretés micro-organiques contenues dans l'eau et empêchent durablement toute possibilité de réactivation ou de contamination par des germes.

Propriétés de l'eau traitée

Un autre avantage de l'AQUA HP-SYSTEME® technologie réside dans le fait qu'en influençant la structure moléculaire la tension de surface de l'eau et sa viscosité se trouvent modifiées. Cela change les propriétés de l'eau traitée, ce qui contribue à optimiser les processus dans les applications industrielles comme les systèmes de nettoyage et de lavage.

2. OBJECTIF DE L'EXPERIENCE

L'objectif des essais et expériences réalisés était de démontrer la capacité de l'appareil HP-SYSTEM à inactiver des microorganismes présents dans un circuit d'eau. C'est pourquoi, les conditions de fonctionnement de l'installation de désinfection HP-SYSTEM pour la réalisation des essais ont préalablement été déterminées.

Conformément aux recommandations du fabricant, l'appareil a été installé dans de nombreux circuits d'eau chaude, tours de refroidissement, fontaines ornementales, etc. afin d'y prévenir la prolifération de bactéries, de spores, de champignons, etc..

Si, après que l'expérience et les résultats obtenus ont été évalués, la capacité d'inactivation de l'installation était démontrée, de nouveaux essais et expériences pourront être planifiés qui dépassent le cadre du présent rapport préliminaire.

3. Installation d'essais

Les essais ont été effectués à l'aide de l'appareil HP-SYSTEM modèle K0 Junior. Il s'agit d'un appareil très compact, composé d'une pompe centrifugeuse et du réacteur HP dans un boîtier fermé sur lequel il suffit de brancher les tuyaux d'arrivée et de sortie d'eau. Les dimensions extérieures de l'appareil K0-Junior sont :

longueur 350 mm, largeur 480 mm, hauteur: 620 mm, poids: 40 kg.

4. Débits

L'appareil permet un débit de 0.5 à 2,5 m³/h. Pour les essais, un débit de 1 m³/h a été choisi afin d'éviter l'accumulation de trop grandes quantités d'eau.

5. Echantillons pour l'expérience

Les échantillons utilisés pour l'expérience consistent en 200 litres d'eau prélevés sur le réseau de distribution d'eau de Barcelone qui ont été traités avec du thiosulfate afin de neutraliser l'effet du chlore.

Les échantillons ont été „dopés“ avec différents types de microorganismes (bactéries et bactériophages). Ce faisant, en plus de l'échantillon destiné à l'expérience un autre échantillon a été mis de côté. Après l'homogénéisation, une fraction d'un litre d'échantillon déjà dopé a été mis de côté et conservé à l'extérieur du circuit pour servir d'échantillon de contrôle de l'expérience.

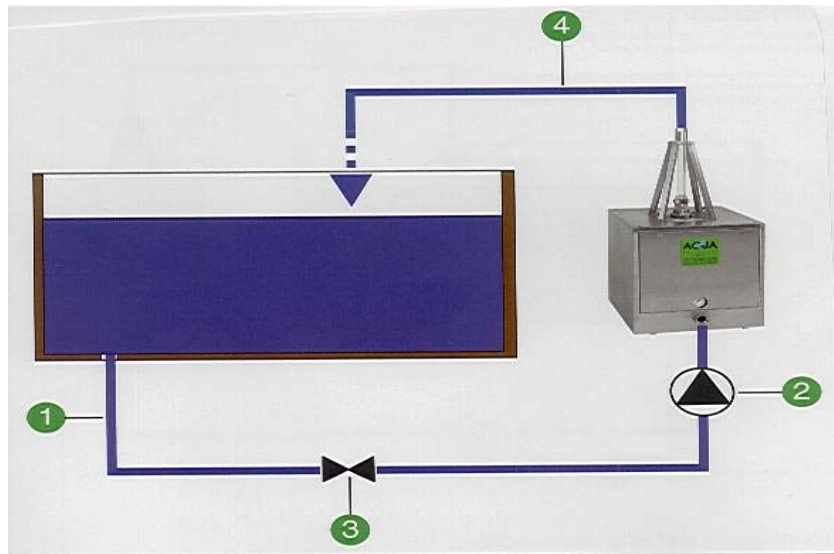
Les échantillons de 200 litres d'eau sont passés à travers l'appareil HP-SYSTEM en respectant les séquences de temps décrites dans le « protocole d'expérience ».

6. Circuit de l'expérience

L'expérience a été réalisée avec un circuit hydraulique composé des éléments suivants :

- Réservoir d'eau de 200 litres.
- Tuyau flexible muni d'accessoires pour aspirer l'eau jusqu'à l'entrée de l'appareil HP-SYSTEM.
- L'appareil HP-SYSTEM, modèle K0 Junior, avec pompe centrifuge incluse.
- Tuyau flexible muni d'accessoires pour l'évacuation de l'eau de l'appareil.
- Appareil mesurant le débit d'eau.

Le schéma suivant montre la configuration des installations pour la réalisation des expériences.



7. Microorganismes utilisés

Souches bactériennes, bactériophages et substrats employés.

7.1.1 Souches bactériennes

On a choisi une bactérie gram + et une autre gram – qui représentent les types « structurels » les plus fréquents :

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Escherichia coli* WG5 (ATCC 700078) (Gravox Cobrough 1986).

7.2 Bactériophages

Deux virus bactériens avec des structures très bien différenciées ont été choisis :

- MS2 (ATCC 15597-B1) ISO 10805-1 (Anonymous 1995)
- B56-3 (ATCC 700786-B1) ISO 10705-4 (Anonymous 2002)

7.3 Substrats de culture

- mFC-Agar (Difco, Becton Dickinson, USA). Ref: 267720
- Chromocult Coliforme Agar (Merck Darmstadt, BRD). Ref: 1.10426
- m Enterococcus Agar (Difco, Becton Dickinson, USA) Ref: 274620

8. Protocole d'expérience

Les différentes expériences ont été réalisées en suivant les étapes suivantes :

- a) Préparation de l'appareil en branchant les tuyaux flexibles d'arrivée et de sortie d'eau correctement raccordés au réservoir d'eau.
- b) Préparation d'un volume d'eau de 200 litres en y ajoutant du thiosulfate.
- c) Mise en marche de la pompe et réglage du débit (1 m³/h).
Avec un tel débit et un volume de 200 litres d'eau, la durée maximale d'essai est de 12 minutes / cycle.
- d) Chronométrer une durée de stabilisation d'au moins 60 secondes. Contrôler le débit en circulation. Eliminer l'eau qui a été traitée pendant cette période.
- e) Ajouter le microorganisme à expérimenter à raison de 1000 cfu/pfu par ml d'eau échantillonnée.
- f) Homogénéiser.
- g) Prélever un échantillon d'eau d'un litre pour l'utiliser comme contrôle.
- h) Parallèlement au début des expériences, un réservoir similaire à celui utilisé avec le réacteur a été mise en place et inoculé avec le même nombre de microorganismes afin de réaliser des expériences de contrôle destinées à démontrer que les microorganismes ne sont pas absorbés par le circuit. Le volume d'eau dans les tuyaux et dans le réacteur ne dépasse pas 4 litres, ce qui représente au plus 2% du volume total de l'échantillon.

- i) Prélever des échantillons aussi bien à partir du circuit d'eau qu'à partir de l'eau de contrôle au début de l'expérience, c'est-à-dire à l'heure zéro, ainsi qu'ensuite à différents moments.
- j) Réaliser des analyses quantitatives et de titre des différents microorganismes, conformément à des protocoles standardisés.
- k) Contrôler en permanence la températures de l'eau. Celle-ci s'est maintenue pendant les expériences en-dessous de 27° C.
- l) Durant la réalisation des expériences, la périodicité du traitement a été la suivante : 8 heures de fonctionnement à partir de l'heure zéro, suivies de 16 heures de repos. Cette périodicité a été répétée toutes les 24 heures.

9. Représentation des résultats

Pour faciliter la compréhension des résultats de chaque expérience réalisée, ceux-ci sont représentés graphiquement. Ces graphiques représentent les résultats des concentrations de microorganismes présentes au cours de l'expérience aussi bien dans l'eau de contrôle que dans l'eau du circuit qui a passé au travers du réacteur.

La « cinétique d'inactivation » obtenue avoisine dans la plupart des cas une ligne droite dont R^2 est plus grand que 0,70.

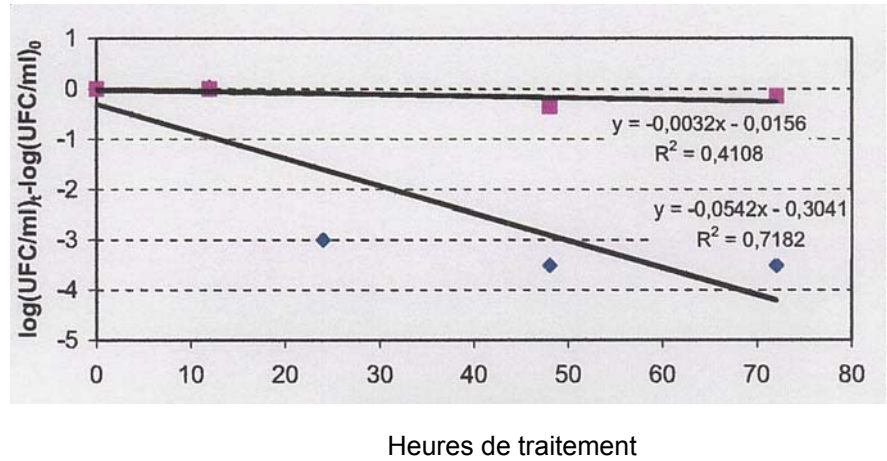
Ce modèle simple nous permet de calculer le T90, soit le temps nécessaire pour éliminer le 90% des microorganismes présents dans l'échantillon. Cette valeur nous sert à mesurer les inactivations des différents microorganismes qui sont, dans notre cas, toutes inférieures à 100 heures.

Dans les expériences de contrôle, une réduction ou inactivation des microorganismes a également eu lieu. Les T90 obtenus étaient supérieurs à 100 heures, ce qui signifie qu'il y a eu une diminution due à l'inactivation naturelle, mais celle-ci a été beaucoup plus faible que celle produite par le réacteur.

10 Résultats

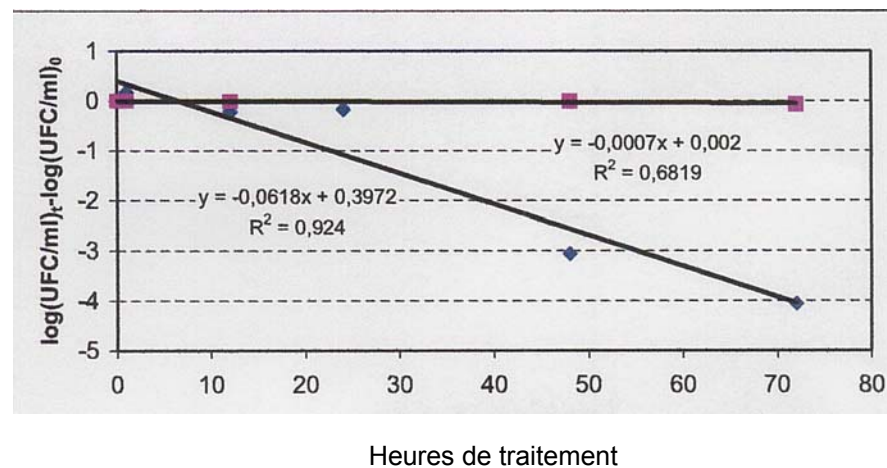
10.1. Inactivation des Entérocoques

Expérience 1:



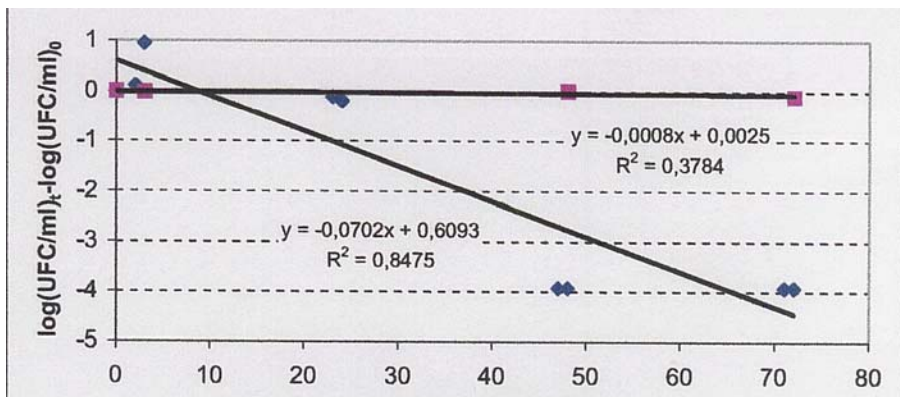
- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

Expérience 2:



- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

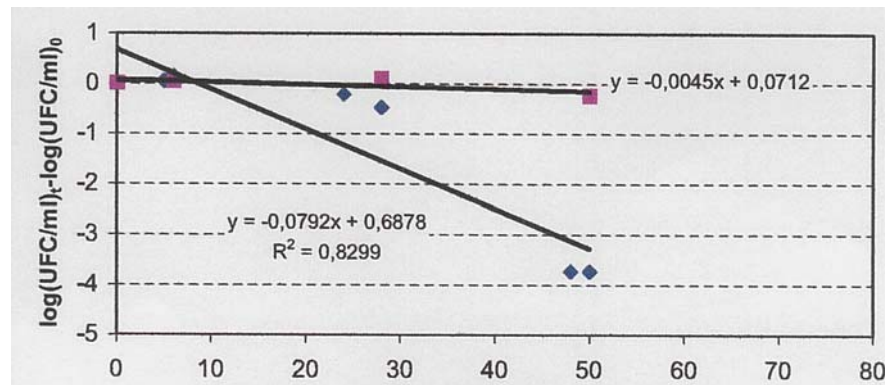
Expérience 3:



Heures de traitement

- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

Expérience 4:

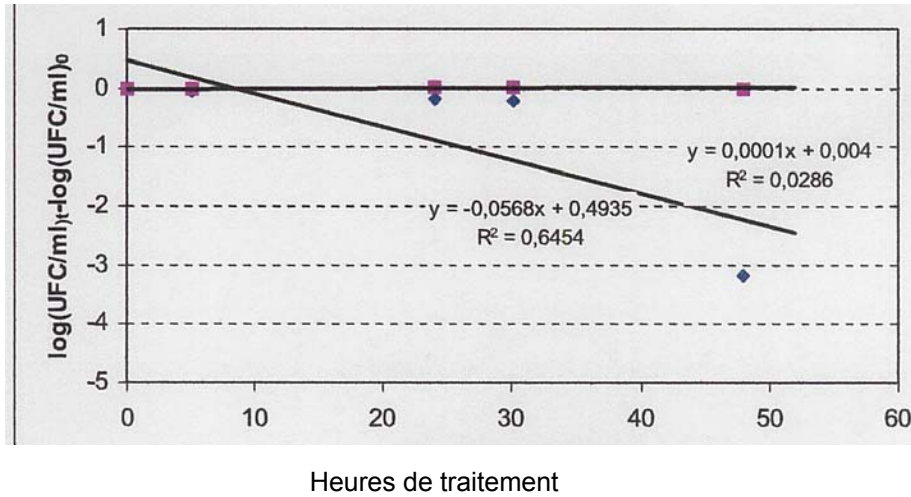


Heures de traitement

- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

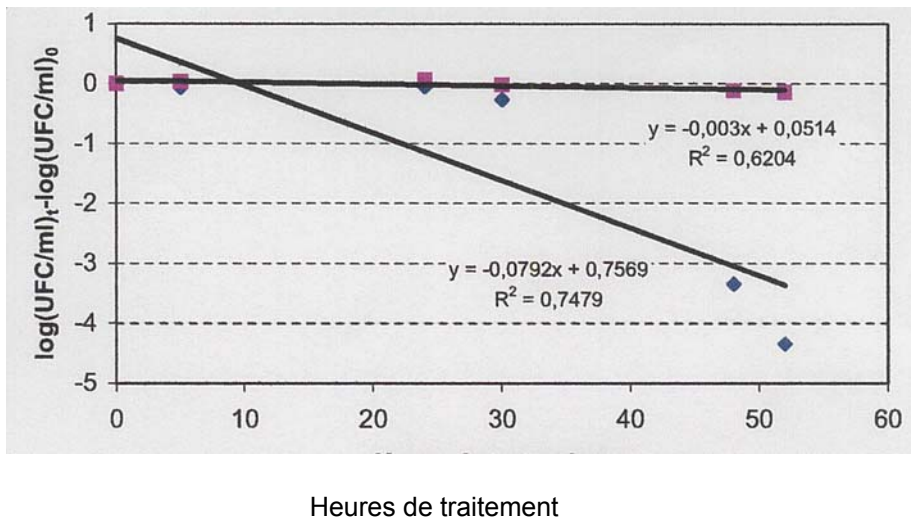
10.2. Inactivation d'*Escherichia coli*

Expérience 1:



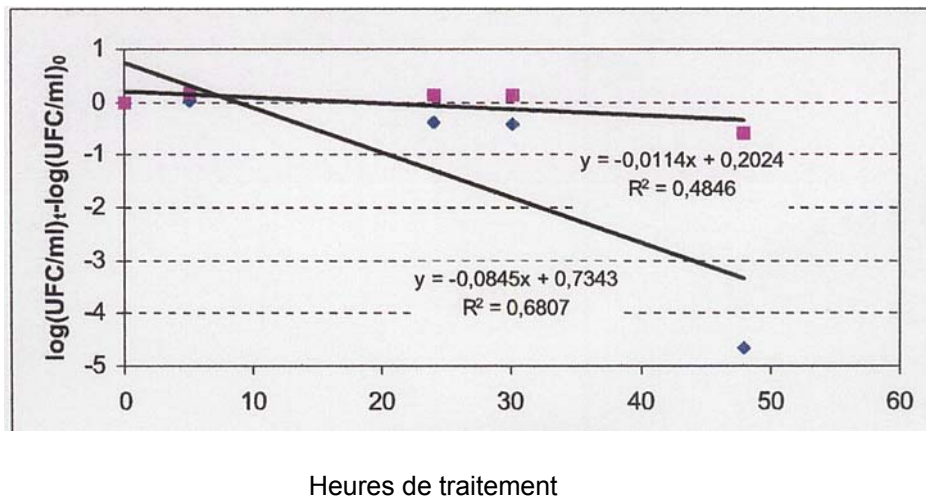
- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

Expérience 2:



- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

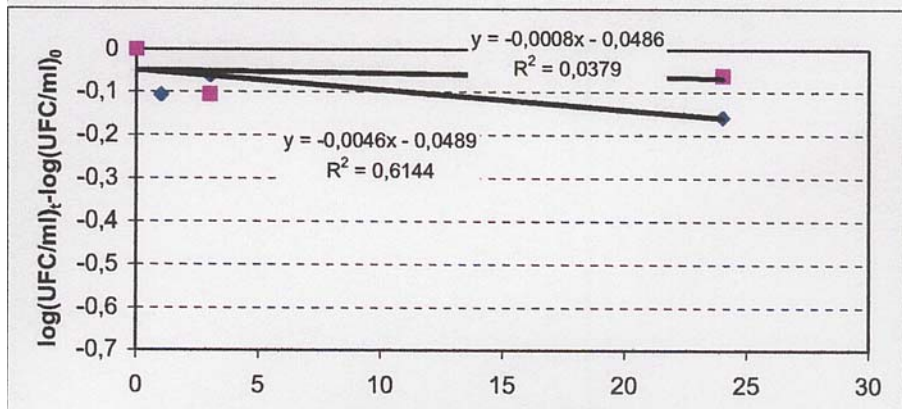
Expérience 3:



- ◆ Eau traitée avec réacteur
- Eau de contrôle sans réacteur

10.3. Inactivation du bactériophage B56-3

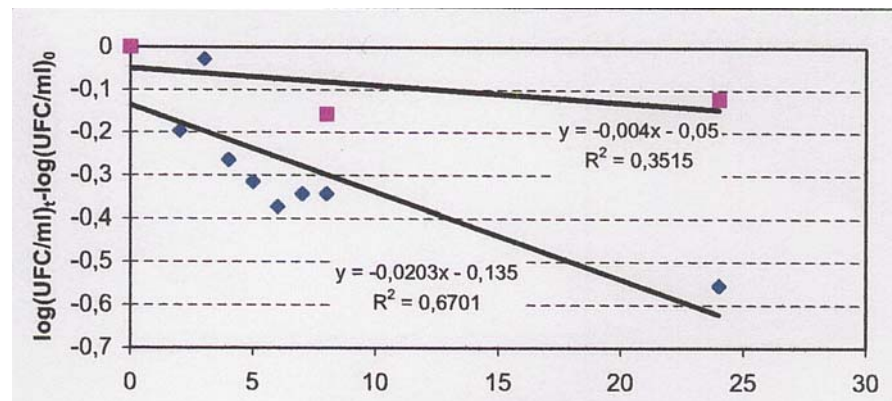
Expérience 1:



Heures de traitement

- ◆ Eau traitée avec réacteur
- Eau de contrôle sans réacteur

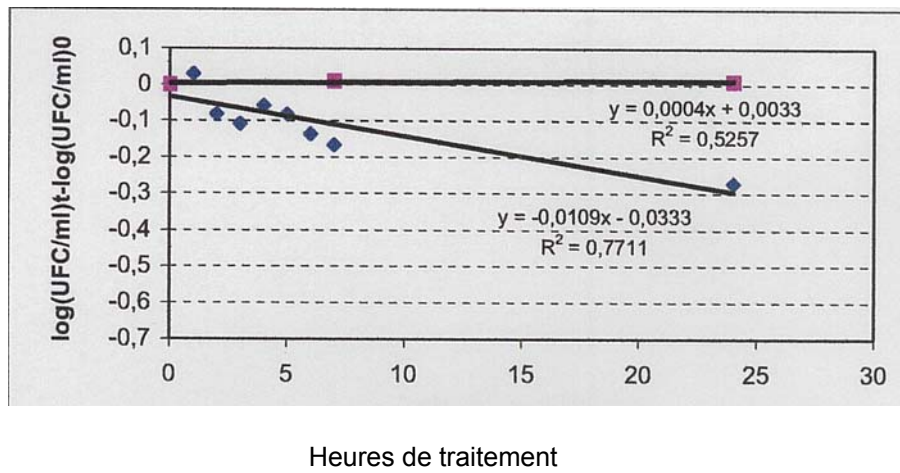
Expérience 2:



Heures de traitement

- ◆ Eau traitée avec réacteur
- Eau de contrôle sans réacteur

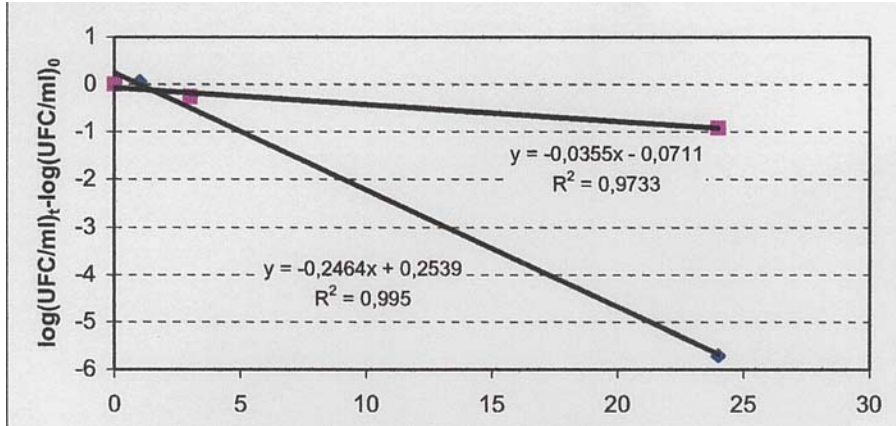
Expérience 3:



- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

10.4. Inactivation des bactériophages MS2

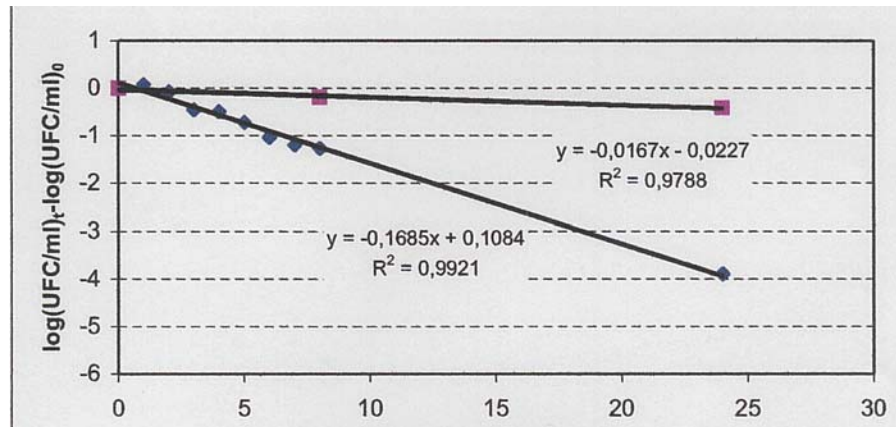
Expérience 1:



Heures de traitement

- ◆ Eau traitée avec réacteur
- Eau de contrôle sans réacteur

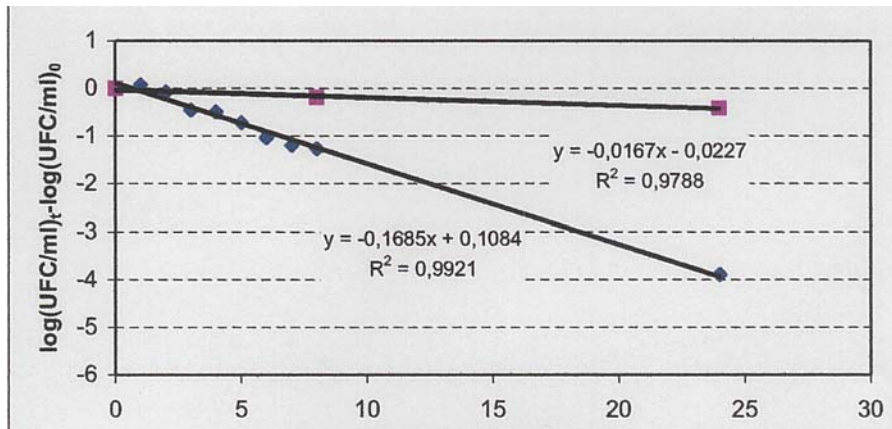
Expérience 2:



Heures de traitement

- ◆ Eau traitée avec réacteur
- Eau de contrôle sans réacteur

Expérience 3:



Heures de traitement

- ◆ Eau traitée avec réacteur ■ Eau de contrôle sans réacteur

Résultats

A partir des cinétiques d'inactivation, on a calculé les temps d'inactivation T90 et T99 (en heures) des différents microorganismes utilisés lors de l'expérience.

Résultats des temps d'inactivation T90 et T99 dans les différentes expériences:

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		<i>Escherichia coli</i> ATCC 700078		Bactériofago MS2 ATCC 15597-B1		Bactériofago B56-3 ATCC 700786-B1	
T90	T99	T90	T99	T90	T99	T90	T99
12,8	31,2	26,3	43,9	5,1	9,1	20,8	42,5
22,6	38,8	22,2	34,8	6,6	12,5	42,6	91,9
22,9	37,2	20,5	32,4	6,6	11,4	88,7	180,4
21,3	33,9	-	-	-	-	-	-

Statistique des T90 et T99 des microorganismes utilisés lors de l'expérience :

	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		<i>Escherichia coli</i> ATCC 700078		Bactériofago MS2 ATCC 15597-B1		Bactériofago B56-3 ATCC 700786-B1	
	T90	T99	T90	T99	T90	T99	T90	T99
Media	19,9	35,2	23,0	37,0	6,1	11,0	50,7	104,9
Des.est.	4,7	3,3	2,9	6,0	0,8	1,7	34,6	69,9
I.C. 95%	7,6	5,4	7,3	15,0	2,1	4,3	85,9	173,2
I.C. 99%	13,9	9,9	16,8	34,2	4,8	9,7	195,7	394,5
V. min,	12,8	31,2	20,5	32,4	5,1	9,1	20,8	42,5
V. máx.	22,9	38,8	26,3	43,9	6,6	12,5	88,7	180,4

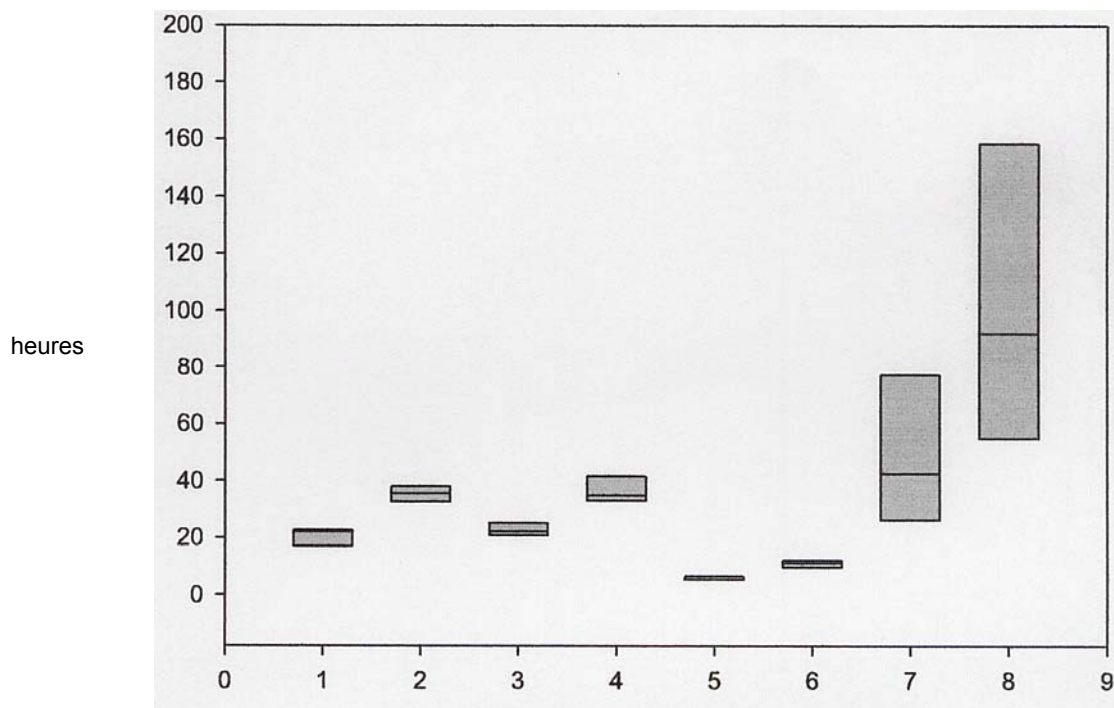
Des est.: Déviation standard

I.C.: intervalles de confiance

V. min: valeur minimum

V. max: valeur maximum

Diagrammes des T90 et des T99 des microorganismes utilisés lors de l'expérience :



Temps d'inactivation T90 et T99 des microorganismes utilisés lors de l'expérience

1: T90 de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

2: T99 de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

3: T90 de *Escherichia coli* QTCC 7000078

4: T99 de *Escherichia coli* QTCC 7000078

5: T90 du bactériophage MS2 ATCC 15597-B1

6: T99 du bactériophage MS2 ATCC 15597-B1

7: T90 du bactériophage B56-3 QTCC 700786-B1

8: T99 du bactériophage B56-3 QTCC 700786-B1

11. Discussion

Dans le cadre du présent travail, des expériences d'inactivation au moyen de l'installation HP-SYSTEM ont été menées dans un circuit fermé de 200 litres d'eau du réseau avec différents microorganismes (deux bactéries : *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* ainsi que deux bactériophages : MS-2 und B56-3).

Les conditions de l'expérience ont permis de déterminer le temps d'inactivation T90, c'est-à-dire le temps nécessaire pour inactiver 90% de la population ou – ce qui revient au même – le temps nécessaire pour réduire la contamination présente selon une unité logarithmique.

Les temps d'inactivation T90 dépendent des caractéristiques des microorganismes utilisés lors de l'expérience. Ainsi, la valeur moyenne du T90 est de 20 heures pour *Enterococcus faecalis*, de 23 heures pour *Escherichia coli*, de 6 heures pour le bactériophage MS2 et de 51 heures pour le bactériophage B56-3. Les résultats de l'inactivation des bactériophages utilisés comme indicateurs de virus montrent que **les virus sont également inactivés par le HP-SYSTEM.**

Ces résultats démontrent l'inactivation microbienne dans les conditions décrites de l'expérience grâce à l'action du réacteur, vu que tous les contrôles effectués parallèlement aux expériences ont présenté des T90 supérieurs à 100 heures. Il apparaît donc que l'inactivation produite par le réacteur est significativement supérieure à celle que subissent les microorganismes de manière naturelle dans l'eau.

Les taux de survie déterminés par les expériences dont les matériaux et méthodes ont été décrits forment dans tous les cas une ligne droite de régression qui, simplifiée à un modèle, permet de conclure à une cinétique de premier rang. Cette cinétique permet de calculer les temps d'inactivation T90 et T99. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'une étude plus détaillée fasse apparaître une autre cinétique d'inactivation.

En avoisinant les 20 heures (20 et 23 heures), les temps d'inactivation T90 des bactéries utilisées dans l'expérience sont très proches entre eux, comme c'est le cas des temps d'inactivation T99 qui sont de 35 et de 37 heures pour les entérocoques et *E. coli*. Etant donné qu'il s'agit de microorganismes-modèles, ils sont représentatifs d'un large spectre de bactéries pouvant être inactivées au moyen du réacteur. **Dans ce spectre on trouve notamment les bactéries du type *Legionella*.**

Ainsi, les indications fournies par le fabricant relatives à l'inactivation de bactéries et à l'emploi de l'AQUA HP-SYSTEME® pour différents types d'installations d'eau sont démontrées.

Le résultat n'a pas été le même pour les bactériophages utilisés lors de l'expérience et qui sont tous deux des virus-modèles. Ainsi, le temps d'inactivation T90 du bactériophage MS2 a été de 6 heures contre 51 heures pour le temps d'inactivation T90 du bactériophage B56-3. La disparité des résultats est due aussi bien aux caractéristiques différentes des bactéries et des bactériophages qu'à celles que les bactériophages présentent entre eux.

En résumé, les résultats présentés mettent en évidence l'efficacité de l'appareil à éliminer des bactéries et des virus dans les conditions de l'expérience. Ces résultats permettent de supposer que cet appareil (AQUA HP-SYSTEME®) est capable, dans des conditions de fonctionnement adéquates, de minimiser l'augmentation de bactéries dans des circuits d'eau fermés et de maintenir la concentration de n'importe quel microorganisme à des niveaux bas, comme le décrit le fabricant dans sa notice d'information sur le produit.

12. Références

Anonymous (1995) ISO 10705-1: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland, International Standardisation Organisation.

Anonymous (2000) ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages. Geneva, Switzerland, International Standardisation Organisation.

Anonymous (2002) ISO 10705-4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. Geneva, Switzerland, International Standardisation Organisation.

Grabow WO & Cobrough P (1988): Practical direct plaque assay for coliphages in 100 ml samples of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 430-433.