



## Protéger la qualité du produit par un suivi microbiologique en temps réel

La croissance de microorganismes dans les produits des industries chimiques peut présenter un problème principal. Si le système est laissé sans surveillance, la **contamination microbienne** dans les matières premières et dans les produits intermédiaires, peut mettre en péril la performance des procédés de fabrication et le bon fonctionnement des équipements. Dans le cas d'un mauvais entretien, ces mêmes sources peuvent aussi impacter la **qualité du produit final** et peuvent détériorer les produits même étant stockés sur une étagère. La **meilleure solution** pour **un industriel chimique** était donc :

- la **détection rapide et anticipée des dérives microbiologiques**
- la mise en place d'actions **proactives** plutôt qu'un traitement **correctif**.

La difficulté de quantification microbienne dans les produits chimiques comme **les peintures, la fabrication de polymères, les produits cosmétiques ou parapharmaceutiques**, réside dans le fait qu'ils sont très chargés en matière en suspension et/ou en composés organique, ce qui est une barrière non négligeable dans le suivi de l'activité biologique. **Aucun outil microbiologique performant** n'était disponible pour **suivre l'activité des microorganismes**.

La détection rapide est **aujourd'hui possible** via les kits de mesure d'ATP-métrie, développés par la société **LuminUltra™** (Canada) et commercialisé par **Aqua-tools** en Europe, notamment à travers de deux produit :

Les **kits TCM™** permettent la mesure de la biomasse active dans les matrices chargées en matières en suspension, tels que la **peinture, l'enrobage, les polymères, les produits cosmétiques ou parapharmaceutiques**.

Les **kits QGO-M™** sont destinés aux échantillons à base de composés organiques et sont utilisés sur des produits de type **latex, les émulsions de polymères...**

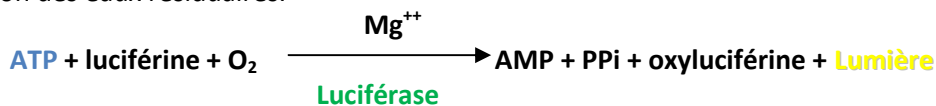
Les kits d'ATP-métrie, dit de **2<sup>nd</sup> Génération**, développés par LuminUltra™ (Canada), permettent de mesurer la concentration de la biomasse vivante à travers la quantification de l'Adénosine TriPhosphate intracellulaire. L'ATP intracellulaire est l'énergie stockée dans toute cellule vivante et qui est dégradée, en quelques minutes, lorsqu'elle est libérée dans l'environnement. Par la mesure de l'ATP intracellulaire, contenu dans les échantillons, on peut connaître, en moins de 5 minutes, la charge microbienne vivante totale, appelée **biomasse active**. Cette technique est aujourd'hui un des meilleurs indicateurs de mesure de la flore totale, permettant **la mesure rapide, sans interférence, de la biomasse active dans les produits de l'industrie chimique**.

## I. Présentation de la technique d'ATP-métrie

La technique d'ATP-métrie permet une **mesure rapide de la concentration de la biomasse active dans l'eau**. L'ATP-métrie est basée sur l'assimilation par les microorganismes de l'Adénosine Triphosphate qui est une molécule essentielle à la vie microbienne.

La molécule d'ATP (Adénosine triphosphate) est retrouvée dans tous les organismes vivants et est indicateur de l'activité métabolique et/ou de la viabilité de la biomasse présente dans les échantillons environnementaux. L'ATP est un transporteur d'énergie situé à l'intérieur des cellules biologiques vivantes et qui gère toutes les fonctions biologiques, telles que la nutrition, l'entretien et la reproduction.

L'ATP est quantifiée par une réaction de bioluminescence. L'enzyme luciférase catalyse la réaction entre la luciférine (substrat), l'ATP (cofacteur) et l'oxygène, ce qui entraîne une émission de lumière. Chaque molécule d'ATP consommée dans la réaction produit un photon de lumière. La production de lumière à partir de cette réaction est mesurée en utilisant **un luminomètre**, dans lequel la quantité de lumière produite est directement proportionnelle à la quantité d'énergie biologique présente dans l'échantillon. Cette réaction est linéaire sur une grande échelle, ce qui permet la mesure notamment dans les stations d'épuration des eaux résiduaires.



## II. Présentation des kits TCM™ et QGO-M™

### 1. Composition du kit TCM™

Le kit TCM™ est destiné à la mesure de la biomasse active dans les eaux chargées en matières en suspensions.

Contenu du kit TCM™	
Luminase	Enzyme Luciférase/Luciférine
UltraCheck1	1ng / mL d'ATP standard
Ultralyse 7	Réactif d'extraction de l'ATP
UltraLute	Tampon de dilution du tATP
LumiSolve	Tampon stabilisant du dATP

Le premier composant essentiel du kit est la Luminase™, complexe Luciférine/Luciférase, qui permettra la mesure de l'ATP disponible dans l'échantillon. La Luminase™ utilisée dans les kits Luminultra™ a été développé afin de permettre, premièrement, une meilleure sensibilité du test pour des faibles concentrations en ATP et deuxièmement, d'éviter la saturation du signal dans les fortes valeurs d'ATP. **Le kit TCM™ a une gamme de quantification allant de 50 à 130.000 pg/ml d'ATP.** Le deuxième composant essentiel du

kit est l'Ultracheck™ : étalon calibré de référence, contenant 1 ng/ml d'ATP. L'Ultracheck™ permet de calibrer la réaction enzymatique et de transformer les résultats analytiques en pg d'ATP.

C'est seulement une fois que les résultats sont transformés en pg d'ATP qu'ils puissent être comparés entre eux. L'Ultracheck™ permet également de vérifier la qualité de la Luminase™ avant les essais.

Le kit Total Control Biologique (TCM™) contient tous les réactifs nécessaires à effectuer l'analyse de 50 échantillons.

## 2. Composition du kit QGO-M™

Quench-Gone Organic (QGO-M) est aussi basé sur la mesure de l'ATP et destiné pour les échantillons à base de composés organiques comme les fluides dans l'industrie métallurgique, les carburants et l'industrie chimique.

Contenu du kit QGO-M™	
Luminase	Enzyme Luciférase + Luciférine
UltraCheck 1	1ng/ml Standard d'ATP
LumiClean	Réactif de nettoyage du filtre
UltraLyse 7 <sup>21</sup>	Agent d'extraction de l'ATP
UltraLute	Tampon de dilution de l'ATP

Ce kit mesure en quelques minutes, l'activité microbologique totale par une simple analyse et prévient tout processus d'une détérioration, de l'optimisation d'une maintenance et d'une intervention pour régler un programme de désinfection. **Le kit QGO-M™ possède une gamme de quantification allant de 4 à  $2 \times 10^6$  pg ATP/mL.**

Le kit Quench-Gone Modified (QGO-M™) contient tous les réactifs nécessaires à effectuer l'analyse de 100 échantillons.

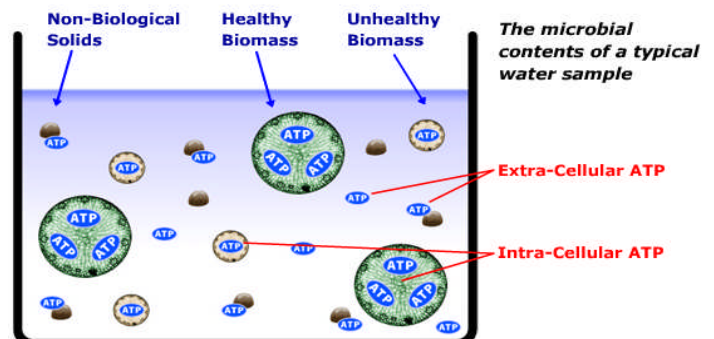
## 3. Les paramètres mesurés

Au sein d'un échantillon d'eau contenant des microorganismes, il existe deux types d'ATP :

- **L'ATP intra-cellulaire (cATP)** c'est-à-dire l'ATP contenu dans les cellules vivantes. Le cATP représente la concentration de microorganismes vivants dans un échantillon
- **L'ATP extra-cellulaire (dATP)** c'est-à-dire l'ATP contenu à l'extérieur des cellules vivantes. ATP extracellulaire est issue des microorganismes stressés ou morts.

→ **L'ATP total (tATP)** est la somme de l'ATP intracellulaire et de l'ATP extracellulaire

Les kits LuminUltra™ sont les seuls outils permettant de quantifier les différentes formes sous lesquels l'ATP est présent dans l'eau : ATP intracellulaire, ATP extracellulaire ATP total, **ceci dans le but d'avoir une vision complète du vivant et de son état de santé dans un bioréacteur.**



## **ATP Intra-cellulaire (cATP) – Mesure de la biomasse vivante dans tout échantillon**

L'ATP intra-cellulaire est la mesure du seul ATP contenu dans les microorganismes vivants.

Afin de le rendre accessible le cATP à la réaction de bioluminescence, l'échantillon d'eau est soumis à une lyse bactérienne, qui permet de détruire les membranes cellulaires et de libérer le cATP :

- Dans la gamme des kits **TCM™**, le cATP™ est calculé par différence entre le dATP™ et le tATP™ (**cATP = tATP - dATP**).
- Dans la gamme des kits **QGO-M™**, la mesure donne un accès **direct et uniquement à la valeur du cATP™**, grâce à une filtration préliminaire de l'échantillon.

**La surveillance de l'ATP permet de quantifier en temps réel la biomasse active vivante et de suivre sa croissance sous des conditions optimales ou de détecter précocement l'inhibition de l'activité sous un environnement stressant ou des conditions opératoires défavorables.**

### III. Etude de cas

Pour bien se rendre compte de l'efficacité de ces suivis par ATP-métrie, nous présentons ici deux **études de cas réalisés sur des sites de production d'industrie chimique**, déjà utilisateurs de notre technique d'ATP-métrie.

#### 1. Utilisation du Kit TCM™ pour le suivi des échantillons de peinture et d'enrobage



Cette présente étude a été menée via le kit TCM™ pour le compte d'un client au sein d'un site de production **de peinture et d'enrobage**.

Les mesures de TCM™ montrent une bonne reproductibilité sur les échantillons de peinture dilués (1mL de peinture/enrobage pour 9mL d'eau stérile). Le tableau suivant récapitule les résultats de 3 échantillons et présente le calcul du Coefficient de Variation (CV), qui mesure la variabilité entre des mesures répétées 2 fois de suite.

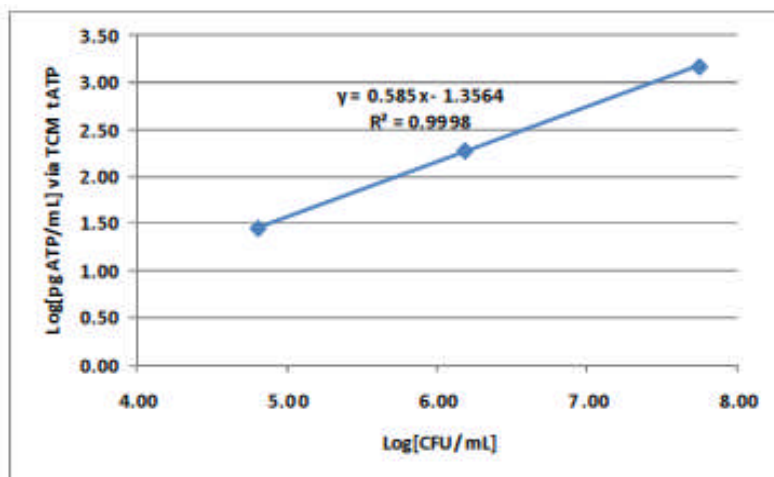
Echantillons	[ATP] Rep 1 (pg ATP/mL)	[ATP] Rep 2 (pg ATP/mL)	[ATP] Moyen (pg ATP/mL)	[ATP] Ecart- type	[ATP] Coefficient de variation
#1	15802	13448	14625	1664	11%
#2	1289	1747	1518	324	21%
#3	51.55	63.00	57.27	8.10	14%

En général, le coefficient de variation d'une méthode microbiologique est considéré satisfaisant lorsqu'il est compris entre 10 et 25%. Pour ces échantillons étudiés, la reproductibilité se trouve dans cette gamme, indiquant donc **une bonne performance du Kit TCM™**.

D'autre part, le test standard pour la mesure des microorganismes dans la peinture et l'enrobage reste la méthode par culture. Mais l'inconvénient de cette méthode est qu'elle permet de quantifier uniquement les bactéries viables et cultivables contrairement à la méthode **TCM<sup>TM</sup> qui quantifie toutes les bactéries qu'elles soient cultivables ou non cultivables.**

Les valeurs obtenues par TCM<sup>TM</sup> sont notées comme la concentration de pg ATP/mL et converties en équivalent microorganismes/mL (**1pg d'ATP est équivalent à 1000 équivalent microorganismes**) et les résultats des essais par culture sont exprimés en UFC/mL. (**UFC : Unité Formant Colonie**)

Echantillon	Kit TCM <sup>TM</sup> (pg/mL)	Kit TCM <sup>TM</sup> (Equivalent microorganismes/mL)	3M Petrifilm <sup>TM</sup> Méthode de culture (UFC/L)
#1	14625	$1.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$
#2	1518	$1.5 \times 10^6$	$6.6 \times 10^7$
#3	57.27	$5.7 \times 10^4$	$3.3 \times 10^3$



Le Kit TCM<sup>TM</sup> est une méthode appropriée pour une réelle quantification de la flore totale, cultivable ou non cultivable. On observe une bonne corrélation entre les résultats obtenus avec le kit TCM<sup>TM</sup> et la méthode réglementaire de test par culture, avec une relation de linéarité quand on passe en échelle logarithmique.

## 2. Utilisation du kit QGO-M™ pour le suivi des échantillons de latex et de polymères d'émulsions



Cette présente étude a été menée via le kit QGO-M™ pour le compte d'un client au sein d'un site de production de **latex et d'émulsions de polymères**.

Les mesures effectuées à l'aide du QGO-M™ montrent une excellente reproductibilité sur les échantillons d'émulsions diluées. Le tableau suivant récapitule les résultats pour 11 échantillons étudiés et présente les calculs du coefficient de variation (CV), qui mesure de variabilité sur des mesures répétées.

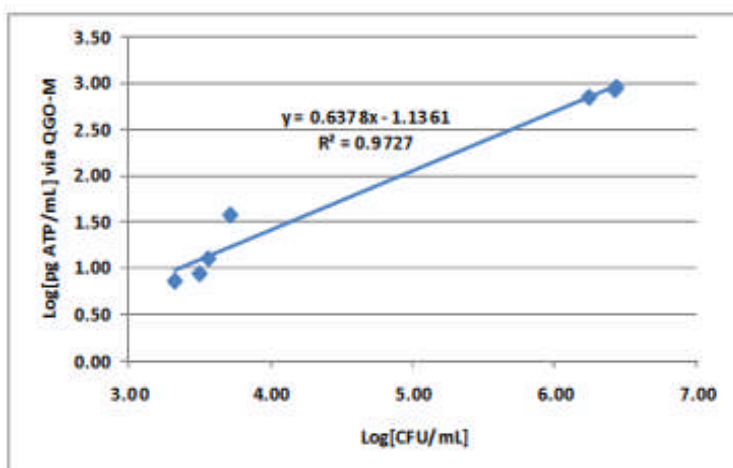
Echantillon	[ATP] Rep1 (pg ATP/mL)	[ATP] Rep2 (pg ATP/mL)	Moyenne [ATP] (pg ATP/mL)	Ecart- type	CV (%)
#1	5.849	8.774	7.312	2.068	<b>28%</b>
#2	8.043	9.505	8.774	1.034	<b>12%</b>
#3	13.89	11.70	12.80	1.551	<b>12%</b>
#4	40.21	35.83	38.02	3.102	<b>8%</b>
#5	949.0	795.5	872.3	108.6	<b>12%</b>
#6	689.5	742.1	715.8	37.22	<b>5%</b>
#7	891.3	938.1	914.7	33.09	<b>4%</b>
#8	644.9	585.7	615.3	41.88	<b>7%</b>
#9	266.1	237.6	251.9	20.16	<b>8%</b>
#10	571.0	607.6	589.3	25.85	<b>4%</b>
#11	660.2	740.7	700.4	56.87	<b>8%</b>

En général, le coefficient de variation est considéré satisfaisant lorsqu'il est compris entre 10 et 25%. Pour tous les échantillons, la reproductibilité se trouve dans cette gamme. La méthode QGO-M™ montre un **CV de 8% en moyenne**, ce qui est une excellente performance pour une méthode biologique. Une seule valeur dépassant le seuil de CV est observé, mais elle concerne pour un échantillon très faiblement chargé en micro-organismes.

Le test standard pour la mesure des microorganismes dans le latex et les émulsions de polymères reste la méthode par culture. Comme dit dans la précédente étude, cette méthode détecte uniquement les bactéries viables et cultivables alors que la QGO-M™ permet la quantification de la flore totale : **microorganismes cultivables et non cultivables**.

Le tableau suivant regroupe les résultats des deux différentes techniques microbiennes pour suivre un système. Les valeurs obtenues par QGO-M™ sont notées comme la concentration de pg ATP/mL et converties en équivalent microorganismes/mL (**1pg d'ATP est équivalent à 1000 équivalent microorganismes**) et les essais par culture sont donnés en UFC/mL(UFC : Unité Formant Colonie). Tous les résultats indiqués dans le tableau sont la moyenne des mesures répétées.

Echantillon	Kit QGO-M (pg/mL)	Kit TCM™ (Equivalent microorganismes/mL)	3M Petrifilm™ Méthode de culture (UFC/L)
#1	7.31	7.3x10 <sup>3</sup>	2.1x10 <sup>3</sup>
#2	8.77	8.7x10 <sup>3</sup>	3.2 x10 <sup>3</sup>
#3	12.80	1.2x10 <sup>4</sup>	3.7 x10 <sup>3</sup>
#4	38.02	3.8x10 <sup>4</sup>	5.3 x10 <sup>3</sup>
#5	872.27	8.7x10 <sup>5</sup>	2.7 x10 <sup>6</sup>
#6	715.80	7.1x10 <sup>5</sup>	1.8 x10 <sup>6</sup>
#7	914.67	9.1x10 <sup>5</sup>	2.8 x10 <sup>6</sup>
#8	615.27	6.1x10 <sup>5</sup>	1.1 x10 <sup>6</sup>
#9	251.88	2.5x10 <sup>5</sup>	8.8 x10 <sup>4</sup>
#10	589.31	5.8x10 <sup>5</sup>	1.2 x10 <sup>6</sup>
#11	700.45	7.0x10 <sup>5</sup>	1.6 x10 <sup>6</sup>



On observe une **bonne corrélation entre** les résultats obtenus avec le kit **QGO-M™** et la **méthode réglementaire de test par culture**. Une relation de linéarité existe quand on passe en échelle logarithmique. D'après ces résultats, le Kit QGO-M semble être une **méthode appropriée pour une réelle quantification de la concentration des micro-organismes**.

### Recommandation de Seuils de contrôle

En s'appuyant sur la linéarité observée précédemment à l'aide des résultats obtenus par QGO-M™ et la méthode de culture, on peut établir un tableau de seuils indicatifs de bon comportement pour un système mais il n'a qu'une valeur informative, car chaque installation est unique.

Action	QGO-M™ ATP	3M Petrifilm™ Méthode de culture (UFC/mL)
Bonne Qualité	0 à 50 pg ATP/ mL	0 à 10 <sup>3</sup> UFC/mL
Action Préventive	50 à 250 pg ATP/ mL	10 <sup>4</sup> à 10 <sup>5</sup> UFC/mL
Action Corrective	250 pg ATP/ mL et plus	10 <sup>6</sup> UFC/mL et plus

#### IV. L'avantage des kits TCM™ et QGO-M™

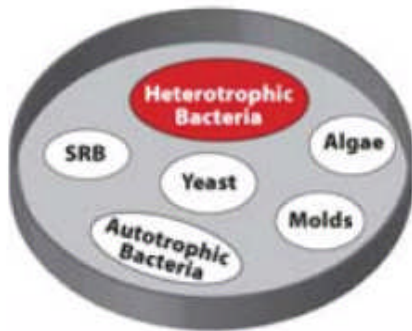
Les kits d'ATP-métrie de 2<sup>nde</sup> génération peuvent être utilisés comme un **outil préventif, une alarme permettant de détecter plus rapidement un dysfonctionnement d'un système** dans de nouvelles applications comme :

- ✓ La peinture
- ✓ La fabrication de polymères
- ✓ L'enrobage
- ✓ Les émulsions de polymères
- ✓ Le latex
- ✓ L'industrie cosmétique
- ✓ L'industrie parapharmaceutique...

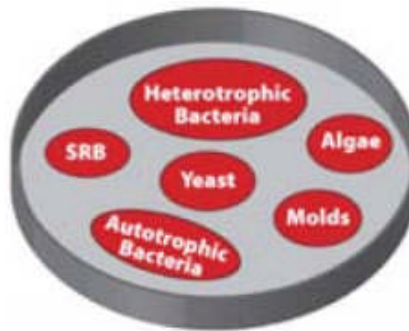
Les kits TCM™ et QGO-M™ ont l'avantage d'être beaucoup plus sensibles tout en fournissant une réponse en quelques minutes alors que plusieurs jours sont nécessaires pour la culture. Egalement, ils fournissent une réponse sur l'ensemble de la population cultivable et non cultivable. Les bénéfices de l'utilisation de ces kits pour l'industrie chimique sont :

- **Mesure en temps réel** de la concentration en microorganismes dans les échantillons et réponse immédiate sur le niveau de contamination
- **Résultats rapides pour validation de lots de production, matières premières**
- **Maîtrise de la contamination microbienne dès la matière première jusqu'au produit fini tout en passant par l'outil industriel**
- **Détection précoce** de la dégradation de la qualité du produit et **localisation des zones à risque** de prolifération de bactéries dans le système de production
- **Identification des origines de contamination microbienne** – matières premières ; outils de production
- **Optimisation des contrôles** : réduction des analyses par culture, à délai de réponse long.
- **Optimisation de traitements de désinfectant et nettoyant sur l'installation**
  - Contrôle de l'efficacité des traitements implémentés sur l'outil de production
  - Correction et validation des actions de nettoyage, rinçage et désinfection
- **Quantification** de tous les organismes vivants (bactéries hétérotrophes et autotrophes, algues, bactéries sulfato-réductrices, levures, moisissures), alors qu'avec la méthode réglementaire par culture, seul un petit pourcentage (2%) de bactéries capable de former des colonies sont détectées (bactéries hétérotrophes).

### Méthode Réglementaire par culture



### Kits TCM ou QGO-M



Technique de mesure	Méthode par culture : Unité format colonie (UFC)	Kits TCM ou QGO-M
Durée	Jours	Minutes
Portabilité	Non portable	Portable
Exactitude	Compte seulement « les particules » microbiennes indépendamment de la taille	Compte les cellules individuellement
Spécificité	Détecte seulement les organismes qui peuvent grandir sur un milieu de culture	Détecte tous les organismes

Les menaces microbiologiques les plus importants se trouvent durant les premières étapes de croissance bactérienne. Le retour d'information en temps réel et la complète portabilité des kits permettront aux opérateurs :

- d'identifier et localiser les points critiques sur le terrain grâce à des cartographies biologiques afin d'intervenir rapidement sur les dérives.
- de valider l'efficacité des traitements mis en place.

Tout en faisant :

- gagner du temps
- l'argent
- en réduisant les risques de contamination.

Aqua-tools est spécialisé dans :

- La commercialisation de kit d'ATP-métrie pour la quantification **rapide des microorganismes**
- L'audit et l'expertise pour le contrôle microbiologique de la qualité de l'eau dans les réseaux d'eau
- Des programmes de formation sur les analyses et le pilotage des risques biologiques dans les eaux sanitaires et les tours de refroidissement.

La nouvelle génération de kit d'ATP-métrie, commercialisée par Aqua-tools, est basée sur la bioluminescence et permet des mesures sur le terrain en moins de 10 minutes pour une meilleure réactivité pour la mise en place d'action préventive et corrective.

Les champs d'applications des kits sont les suivantes :

- Tours de refroidissement
- Production et distribution d'eau potable
- Eau pure à eau ultra pure
- Fluides des industries métallurgiques
- Bain de cataphorèse
- L'activité des boues dans le traitement d'eau des bassins biologiques
- Eaux sanitaires
- Eau de process
- Biofilm
- Huile & gaz
- Traitement de surface
- Eau de réutilisation
- Autres...