

Bourse d'étude de l'Afreth attribuée à Sophie Pécastaings

Optimisation de la lutte contre les légionelles et autres opportunistes dans les réseaux d'eau minérale naturelle, grâce à un pilote "eau thermale".

Pr Cang Nguyen Ba, K Dubourg, S Pécastaings

*Institut du thermalisme, Université Victor Segalen Bordeaux 2,
8 rue Sainte-Ursule, 40100 Dax*

1. Résumé

1.1 Justification

Ces dernières années, l'émergence de pneumopathies graves liées à la bactérie *Legionella pneumophila* a abouti au durcissement des réglementations concernant la qualité microbiologique de l'eau.

L'activité thermale est pleinement concernée par ce problème, comme en témoignent l'arrêté et la circulaire du 19 juin 2000 (DGS/VS 4 n°2000-336) relative à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux, qui recommande de ne détecter aucun micro-organisme pathogène dans les eaux minérales naturelles.

Face aux difficultés d'application de cette réglementation, l'Institut du thermalisme - Université Victor-Segalen Bordeaux 2, souhaite effectuer des recherches en vue d'améliorer les méthodes de conception des réseaux d'eaux minérales naturelles et de définir un protocole de désinfection optimal de ces réseaux, en fonction des profils physico-chimiques des eaux minérales naturelles.

1.2 Objectif

Pour répondre à ces questions, l'Institut du Thermalisme a, dans un premier temps, imaginé un pilote "eau thermale", véritable réseau d'eau minérale naturelle, semblable à ceux des établissements thermaux (le descriptif technique est donné en annexe).

Ce projet, qui a reçu l'aval de cabinets d'expertise et de la Ddass des Landes, a été construit grâce au soutien financier du Conseil régional d'Aquitaine et du Conseil général des Landes. Dans un deuxième temps, les analyses microbiologiques (BMO et BM1, bactéries du biofilm) et physico-chimiques de l'eau du pilote permettront de clarifier plusieurs points :

- Des études ont montré que certains matériaux de canalisation inhibent le développement bactérien *in vitro* [17]. Qu'en est-il *in situ*, au sein d'un véritable réseau ? La réponse à cette question nous permettra peut-être de privilégier un matériel particulier pour la construction d'un réseau d'eau thermale.

- La réglementation du 19 juin 2000 recommande l'utilisation de certains produits ou méthodes de désinfection. Certains facteurs, notamment le développement de biofilms,

peuvent augmenter la résistance des bactéries [9]. En déterminant in situ l'efficacité de ces méthodes, nous serons en mesure de dire lesquelles nous paraissent les plus adaptées à la désinfection des réseaux d'eau minérale naturelle.

- On sait que certains dysfonctionnements (augmentation ou baisse de la vitesse de circulation de l'eau du réseau, fuite, bras mort...) peuvent être à l'origine du développement de biofilms susceptibles d'héberger des bactéries pathogènes. Afin de mieux comprendre l'impact de tels dysfonctionnements, il serait intéressant de modéliser le développement bactérien dans un réseau au cours du temps afin d'engager des méthodes de désinfections adéquates.

1.3. Plan expérimental

Afin de comparer les différents procédés de désinfection en terme d'efficacité et d'effets sur les différents matériaux de canalisations, chaque méthode donnée sera étudiée séparément grâce au pilote «eau thermale» et se déroulera selon le protocole suivant :

- désinfection du pilote grâce à un choc thermique ;
- inoculation d'une suspension d'une espèce bactérienne donnée à une concentration donnée au niveau de la bache de stockage ;
- désinfection selon la méthode à tester ;
- tout au long de l'expérience, des prélèvements d'eau minérale naturelle circulant dans le réseau seront réalisés en vue d'effectuer des analyses microbiologiques visant les recherches des germes inoculés et physico-chimiques (de type CM).

L'évolution du niveau de contamination du réseau tout au long de l'expérience nous permettra de conclure quant à l'efficacité de la méthode de désinfection testée et son effet sur les matériaux de canalisations testés.

1.4. Résultats attendus et implications potentielles

À travers ces recherches, l'Institut du thermalisme souhaite mettre au point un processus de désinfection des réseaux d'eaux minérales naturelles optimisé, simple et rentable afin d'assurer la sécurité des patients. Nous souhaitons en outre améliorer les méthodes de conception des réseaux d'eau thermale.

2. Justification de l'étude

Les problèmes de légionelloses survenus ces dernières années dans les établissements de santé se sont fortement répercutés sur l'activité thermale.

En effet, la bactérie *Legionella pneumophila*, responsable d'environ 80% des légionelloses [11], se transmet certainement exclusivement de manière aérienne, par le biais d'aérosols contaminés. Or les soins dispensés dans les établissements thermaux (douches à jets, aérobains...) placent régulièrement des patients parfois immunodéprimés en contact direct avec des gouttelettes d'eau thermale potentiellement contaminées, d'où un risque de contamination accru.

Consciente de ce danger, la Direction générale de la santé a émis, en 2000 un arrêté et une circulaire relatifs à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux

(circulaire Dgs/vs 4 n°2000-336 du 19 juin 2000, arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales).

La réglementation du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux [1] a pour but de préciser les recommandations destinées à prévenir le risque d'infection résultant d'une mauvaise condition d'exploitation et d'utilisation de l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux.

Selon la circulaire, la qualité microbiologique des eaux minérales naturelles à usage thérapeutique doit être très surveillée, et aucun micro-organisme pathogène ou témoins de contamination fécale ne doit être détecté par les méthodes d'analyse préconisées.

En outre, la circulaire fixe la fréquence et la nature des analyses devant être effectuées sur les eaux minérales naturelles, en fonction des points d'usages.

Il existe trois types de points d'usage :

- type 1 : l'eau est en contact direct avec les muqueuses respiratoires ou susceptible d'entrer en contact avec les muqueuses oculaires et respiratoires ;
- type 2 : l'eau est en contact avec les muqueuses internes ;
- type 3 : l'eau est utilisée pour des soins externes.

Les analyses effectuées sont :

De type CM pour définir les paramètres physico-chimiques de l'eau minérale : température, pH, conductivité, alcalinité, concentration en un élément caractéristique de l'eau minérale naturelle, indicateur de traitement pour les piscines, recherche de résidus de désinfectants aux points d'usage.

De type BMO ou analyse microbiologique de l'eau classique : bactéries revivifiables à 36°C après 48h et à 22°C après 72h, par ml ; coliformes totaux, coliformes thermotolérants et *Escherichia coli* dans 250 ml ; entérocoques dans 250 ml ; spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans 50 ml ; *Pseudomonas aeruginosa* dans 250 ml ; pour les piscines, staphylocoques pathogènes dans 250 ml.

Aucune des bactéries recherchées ne doit être détectée par les méthodes d'analyses imposées (normes afnor 4-7). La flore revivifiable doit, en outre, être constante dans le temps (norme afnor 2).

De type BM1 : aucune colonie de *Legionella* spp (dont *Legionella pneumophila*) ne doit être détectée dans un litre d'eau minérale naturelle selon la méthode imposée (norme afnor 3).

La fréquence des analyses est rapportée dans le tableau I.

* analyses pouvant devenir trimestrielles si aucune contamination n'est constatée pendant 1 an.

Le troisième paragraphe de la circulaire recommande des méthodes pour la conception des réseaux d'eau thermale, ainsi que des stratégies de nettoyage et de décontamination. Enfin, de nouvelles méthodes permettant de réduire le temps de détection des légionelles dans les réseaux sont proposées aux professionnels.

Selon l'équipe de recherche de l'Institut du thermalisme, certains points abordés par la circulaire, comme les techniques de désinfection, pourraient être précisés. C'est

Tableau I : Fréquence des prélèvements imposée par la réglementation du 19 juin 2000

Points de prélèvements	Fréquence des analyses		
	CM	BM0	BM1
Ressource	Trimestrielle	Trimestrielle	
Point d'usage type 1	Trimestrielle	Mensuelle *	Mensuelle *
Point d'usage type 2	Trimestrielle	Mensuelle *	Trimestrielle
Point d'usage type 3	Trimestrielle	Mensuelle *	Trimestrielle

pourquoi nous avons fait de l'optimisation des méthodes de désinfection un de nos axes prioritaires de recherche.

Originalité du projet

Du fait de l'augmentation des cas de légionelloses nosocomiales, les études concernant les paramètres influant sur le développement de légionelles et autres opportunistes dans les réseaux d'eau potable se sont multipliés ces derniers temps.

D'une manière générale, on retrouve deux types d'études :

- Études menées *in vitro*. Ces études consistent à mettre des bactéries en présence de produits désinfectants puis à étudier la diminution de la concentration en micro-organismes. Les expérimentateurs utilisent le plus souvent des chémostats pour mimer un réseau permettant de maîtriser les paramètres opérationnels (débit, etc.) et environnementaux (température, etc.).

C'est le cas par exemple d'une étude menée par Walker et son équipe démontrant par cette méthode l'efficacité d'un biocide contenant du brome sur un consortium de bactéries planctoniques et de bactéries formant des biofilms (*Legionella pneumophila* séro-groupe 1, *Pseudomonas* spp, *Methylobacteria* spp, *Actinomyces* spp, *Flavobacterium* spp [19]).

De la même manière, J Rogers et al. [17] ont pu montrer l'effet inhibiteur du cuivre sur le développement du biofilm et la prolifération de *Legionella pneumophila*, grâce à un système particulier de "double chémostat" reproduisant les conditions retrouvées dans un réseau d'eau potable.

Les résultats de ces études sont cependant difficilement extrapolables aux situations réelles étant donné les nombreux paramètres variables des véritables réseaux (matériaux ou diamètre des canalisations, débit de l'eau...).

- Études menées *in situ*. Les méthodes de désinfection sont testées en conditions réelles. Leur efficacité est mesurée par des analyses de l'eau du réseau d'un bâtiment étudié (hôpital le plus souvent) où l'on utilise un protocole de désinfection donné [8,13,18]. Ces études, menées *in situ*, sont cependant très longues. En outre, il s'agit uniquement d'observations : l'expérimentateur ne peut agir sur aucun paramètre afin d'en étudier l'effet. Ainsi, les comparaisons des méthodes de désinfection sont difficiles, le niveau de contamination initial, la configuration des réseaux, les protocoles de décontamination etc. variant en fonction des établissements choisis pour les études.

Il est cependant possible de mener des études *in situ* tout en permettant à l'expérimentateur

tateur d'agir sur certains paramètres (protocoles de désinfection, niveau de contamination initiale du réseau, matériaux de conception du réseau, etc.). De tels travaux nécessitent la construction d'outils particuliers, des réseaux d'eau "pilotes" adaptés aux activités de recherche. Ce type d'outil permet entre autres d'étudier les méthodes de désinfection (chloration, traitement par la chaleur, ozonation et utilisation de rayons UV par exemple [16]), ou encore le développement de biofilms à l'intérieur des réseaux [14].

Convaincue de l'utilité de ces réseaux pilotes pour la recherche microbiologique, l'équipe de recherche de l'Institut du thermalisme a décidé d'engager la construction d'un pilote «eau thermale» pour mener des études concernant la désinfection des réseaux d'eau minérale naturelle. Il s'agit d'un véritable réseau d'eau thermale à usage thérapeutique, semblable à ceux des établissements thermaux et comportant quelques améliorations (notamment une partie totalement amovible où différents types de canalisations peuvent être insérés). Il est alimenté directement en eau minérale naturelle de Dax (température : 60,8°C).

Le descriptif technique de cet outil est détaillé dans la partie 4.1.

3. Objectifs de l'étude

Face aux difficultés d'application de la réglementation du 19 juin 2000 [1] précédemment décrite, l'Institut du thermalisme - Université Victor-Segalen Bordeaux 2, souhaite effectuer des recherches en vue d'améliorer les méthodes de conception des réseaux d'eaux minérales naturelles et d'optimiser les protocoles de désinfection de ces réseaux en fonction des profils physico-chimiques des eaux minérales naturelles et des matériaux de canalisation.

Grâce au pilote «eau thermale», véritable réseau d'eau minérale naturelle, l'Institut du thermalisme souhaite approfondir plusieurs points.

3.1. L'efficacité des méthodes de désinfection

La réglementation du 19 juin 2000 recommande l'utilisation de certains produits ou méthodes de désinfection : utilisation de dérivés chlorés, eau oxygénée et chocs thermiques.

Des études montrent que ces méthodes sont parfois peu efficaces, notamment sur les bactéries au sein de biofilms (rapport du groupe de travail ECOMICTH, L Alleron [10]) dont *Legionella pneumophila*.

De plus, certains matériaux résistent mal à ces traitements de choc [15].

La détermination in situ de l'efficacité de ces méthodes ainsi que de la résistance des différents matériaux testés nous permettront de définir les méthodes nous paraissant les plus adaptées à la désinfection des réseaux d'eaux minérales naturelles.

3.2. L'étude des propriétés des matériaux de canalisation (Inox 316 L, Cuivre, PVC-HTA)

De nombreuses études montrent que certains matériaux, le cuivre par exemple, inhibent le développement du biofilm [17] ou font l'objet de problèmes de corrosion ou

d'entartrage [15]. Ces études sont souvent menées in vitro et la conséquence de l'utilisation de ces différents matériaux peut difficilement être évaluée au sein d'un véritable réseau. Le pilote "eau thermale" est doté d'une partie amovible. Différents types de canalisations (inox 316L, PVC-HTA, cuivre) peuvent y être insérés. De cette manière, nous espérons déterminer l'impact de ces matériaux sur le développement bactérien mais également les méthodes de désinfection auxquels ils sont plus sensibles.

3.3. L'étude de l'impact des dysfonctionnements d'un réseau

On sait que certains dysfonctionnements (vitesse de l'eau dans le réseau, fuite, bras mort...) peuvent être à l'origine du développement de biofilms susceptibles d'héberger des bactéries pathogènes.

Or il est possible de simuler dans le pilote "eau thermale" tous ces défauts de fonctionnement : ce réseau contient en effet un bras mort, et il est possible de réguler le débit de l'eau grâce à la pompe à débit variable.

Ainsi, pour mesurer l'impact de ces anomalies de fonctionnement, il serait intéressant de modéliser au cours du temps le développement bactérien dans le pilote en présence de tels problèmes.

À terme, grâce à la synthèse de ces résultats, nous espérons optimiser les protocoles de désinfection, en fonction des profils physico-chimiques des eaux minérales naturelles, et de préconiser certains matériaux et règles de construction pour de nouveaux réseaux, sachant que notre priorité à ce jour est de travailler sur l'eau minérale naturelle de Dax. Notre but à travers ces études est d'apporter des précisions quant à la réglementation du 19 juin 2000, et ainsi permettre aux professionnels du thermalisme de respecter plus facilement les exigences en matière de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle à usage thérapeutique.

4. Plan expérimental - calendrier

Chaque méthode de désinfection sera étudiée séparément, pour un matériau donné et une espèce bactérienne donnée, et se déroulera selon le protocole suivant (Fig. 1).

1. Désinfection préalable par choc thermique du réseau à $t = 0j$.
2. Analyses de l'eau minérale naturelle (vérification de la conformité microbiologique de l'eau minérale naturelle avant le démarrage des expériences) à $t = 1j$.
3. Inoculation d'une concentration donnée de bactéries d'une espèce donnée au sein du réseau à $t = 3j$.
4. Analyses microbiologiques après inoculation (vérification de la contamination du pilote) à $t = 6j$.
5. Désinfection par la méthode à tester à $t = 7j$.
6. Analyses bactériennes après désinfection à $t = 7j, 8j, 9j, 15j$ et $20j$.

Il est à noter que, dans un premier temps, les études seront entièrement réalisées avec de l'eau minérale naturelle de Dax, mais il sera possible d'effectuer des recherches

supplémentaires avec d'autres types d'eaux thermales.

Nous procéderons de même pour chaque étude de produit et chaque matériau et chaque espèce bactérienne que nous aurons sélectionné.

Au total, chaque étude devrait s'étaler sur une période d'environ un mois, comme le décrit la figure 1.

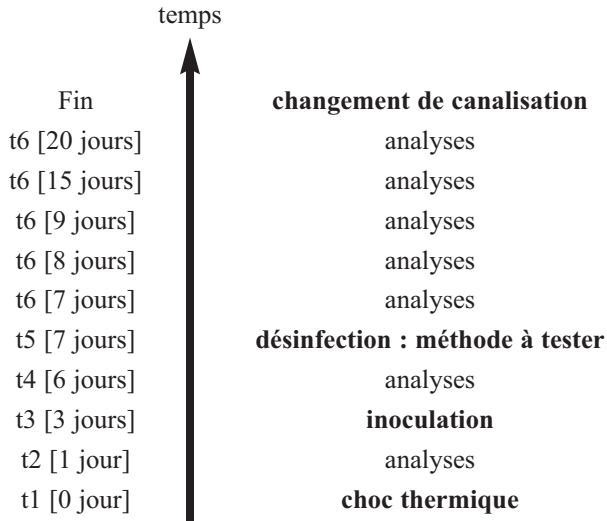


Figure 1- Déroulement de l'étude d'une méthode de désinfection en fonction d'un type de matériau étudié et d'une espèce bactérienne

Avant chaque expérience, l'ensemble du réseau sera désinfecté par choc thermique ($t = 0j$), ceci afin de créer des conditions de départ les plus proches possible de la stérilité. Nous tenterons ainsi d'assurer que toutes les contaminations observées dans le réseau proviennent de nos inoculations et non de contaminations extérieures. Cette étape de désinfection sera suivie d'analyses visant à vérifier la conformité microbiologique de l'eau minérale naturelle avant le démarrage des expériences.

Si l'eau thermale s'avère être de bonne qualité, nous procéderons aux inoculations bactériennes au niveau de la bache de stockage (t_3, j_3). Nous espérons partir d'une concentration bactérienne initiale dans le réseau de 10^4 à 10^7 UFC/ml, mais cette concentration est encore en cours de détermination (études préliminaires en cours).

En fonction des études, les bactéries inoculées seront les souches de référence de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, séro-groupe 1, ou bien des bactéries du biofilm (*Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp).

Selon les études réalisées, ces bactéries seront inoculées au réseau séparément ou bien en consortium (*Legionella pneumophila* et bactéries du biofilm par exemple).

Les colonies bactériennes pures seront préalablement cultivées dans un milieu pauvre en nutriments ceci afin d'éviter des pertes bactériennes dues au changement de milieu.

Afin d'assurer la contamination de la totalité du réseau, l'eau contaminée circulera en circuit fermé pendant une heure. Le niveau de contamination initial du réseau sera vérifié avant de démarrer chaque expérience par des analyses microbiologiques, jour 6 (t4) au niveau des onze points de prélèvements.

L'étape suivante consiste en la désinfection du réseau au moyen de la méthode à tester (t5, j7). Les produits que nous comptons étudier sont, pour le moment, au nombre de neuf. Ils seront utilisés dans le réseau selon les instructions des fabricants. Ce sont :

- composés chlorés générant des hypochlorites (hypochlorite de sodium, concentration en chlore libre finale = 50 mg/L),
- acide peracétique (2.5%, 3.5%, 15%) et eau oxygénée (H2O2, 1000 mg/L),
- brome,
- composés phénolés,
- ammonium quaternaires,
- aldéhydes.

Pour ces quatre derniers produits, les concentrations d'utilisation ne nous ont pas encore été communiquées.

Nous souhaitons également étudier deux produits en cours de formulation dont un à base de peroxyde d'hydrogène et d'ions argent actuellement encore en cours de formulation ainsi qu'une nouvelle méthode de désinfection par filtration.

Durant les jours suivant la désinfection, le pilote sera utilisé de la même manière que dans un établissement thermal. Le système fonctionnera donc en circuit ouvert environ 4h par jour. Ce mode de fonctionnement a deux buts : se rapprocher au maximum des conditions d'utilisation réelles d'un réseau d'eau minérale naturelle et assurer un temps de stagnation qui nous permettra d'observer d'éventuels phénomènes de modification de la composition de l'eau (relargage d'ions Cu^{2+} par les canalisations en cuivre par exemple).

Nous analyserons, dans un premier temps, trois matériaux de canalisation : le cuivre, l'inox 316L et le PVC-HTA.

5. Analyses

Pour mesurer l'efficacité d'un produit de désinfection, nous avons choisi de mesurer la baisse du niveau de contamination engendrée par la méthode de désinfection utilisée.

Les analyses consisteront donc à rechercher les germes inoculés, au niveau des onze points de prélèvement. Selon les germes étudiés, nous rechercherons les germes témoins de contamination fécale (coliformes totaux et thermotolérants, dont *E coli* dans 250 ml d'eau ou entérocoques fécaux dans 250 ml d'eau ou spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices dans 50 ml ou *Pseudomonas aeruginosa* dans 250 ml ou *Legionella* dont *Legionella pneumophila* dans 1 litre. Ces analyses se feront selon les normes AFNOR en vigueur (3-7).

La fréquence de ces analyses est représentée sur la figure 1. Le jour de la désinfection (j7), des prélèvements seront effectués toutes les deux heures. Par la suite, d'autres examens nous permettront d'évaluer le temps de recontamination du réseau (jour 8, jour 9, jour 15 et jour 20).

Nous serons également amenés à travailler sur les bactéries du biofilm formé dans les canalisations, au niveau des manchettes témoins. Ces bactéries seront prélevées à la même fréquence que précédemment, directement au niveau des manchettes témoins par grattage ou par sonication puis culture sur un milieu pauvre en nutriment (milieu R2A). Nous procéderons à l'identification des différentes colonies observées (galeries d'identification et méthodes de biologie moléculaire).

Les analyses physico-chimiques de l'eau minérale naturelle (analyse CM standard) réalisées sur les mêmes prélèvements que précédemment nous permettront de comprendre l'influence de certains paramètres (température, pH, concentration ionique..) sur le développement bactérien ou la formation de biofilm.

En outre, en fonction du matériel étudié, nous rechercherons la présence dans l'eau d'ions cuivre (par chromatographie ionique) ou de trihalométhanes (par absorption atomique) pouvant être relargués par les matériaux de canalisations. Les prélèvements pour ces analyses se feront toujours après une période de stagnation de l'eau dans le réseau.

En un mois, nous réaliserons 66 prélèvements d'eau, et environ 530 analyses microbiologiques (environ 16 000 analyses en trois ans).

Le tableau de report des résultats des analyses est donné en annexe.

6. Moyens

6.1. Pilote "eau thermale"

Le pilote "eau thermale" est l'outil central des études des effets des méthodes de désinfection, des matériaux de canalisation et des dysfonctionnements d'un réseau sur la qualité microbiologique de l'eau.

La construction de ce projet, qui a reçu l'aval de cabinets d'expertises et de la Ddass des Landes (en annexe), a été soutenue financièrement par le Conseil régional d'Aquitaine et par le Conseil général des Landes. Ce pilote se trouve aujourd'hui dans le plateau technique de l'Institut du thermalisme, véritable hall accueillant diverses technologies thermales.

Il s'agit d'un véritable réseau d'eau thermale, semblable à ceux des établissements thermaux. Il a en outre fait l'objet de quelques améliorations nécessaires aux activités de recherche : robinets de prélèvements, canalisations amovibles, manchettes témoins, équipement de mesure de température, de débit et de pression de l'eau en tout point du réseau.

Nous avons retenu l'inox 316 L comme matériel constitutif du pilote "eau thermale". Il s'agit en effet du matériau le plus utilisé pour la conception de réseaux d'eau dans les établissements thermaux.

En début de circuit, l'eau est stockée dans une bache de 500 L assurant également la disconnexion du circuit. Elle est équipée d'une résistance permettant la désinfection du réseau par chocs thermiques.

La mise sous pression de l'eau est assurée par une pompe à vitesse variable, correctement dimensionnée capable d'assurer un débit de 5 m³/h dans le réseau.

Comme dans les réseaux d'eau des établissements thermaux, le pilote est doté de deux échangeurs à plaques assurant la diminution de la température de l'eau thermale à 38°C pour les soins de rhumatologie, et à 28°C pour les soins de phlébologie.

Un bras mort a été ménagé après les deux échangeurs afin d'en étudier l'impact sur le développement bactérien.

L'eau arrive ensuite dans la partie amovible du pilote, où différents types de canalisations (PVC-C, acier galvanisé, cuivre, polypropylène, polyéthylène réticulé, polybutylène etc.) pourront être insérés, en vue d'étudier les caractéristiques.

Pour terminer, l'eau est soit rejetée à l'égout, soit dirigée vers la bache de stockage pour être ré-utilisée lorsque le système fonctionne en circuit fermé.

Le pilote est équipé de divers éléments de contrôle (manomètres, débitmètres, thermomètres) permettant de connaître tous les paramètres susceptibles d'influer sur la formation de biofilm ou d'un développement bactérien.

Des robinets de prélèvements d'échantillons, au nombre de onze, permettent d'analyser l'eau aux points stratégiques du réseau : à la sortie de la bache de stockage ; avant et après la pompe ; avant et après les deux échangeurs ; avant et après chaque canalisation à tester. Leur position a été étudiée pour permettre une connaissance précise de la qualité microbiologique de l'eau thermale en tout point du pilote.

Quatre manchettes disposées le long du réseau servent de témoins de l'état général de corrosion et d'entartrage du système.

Enfin, l'armoire électrique, branchée en parallèle du circuit, gère l'alimentation électrique de la bache, des pompes et des échangeurs.

6.2. Appareil à chromatographie ionique

L'analyse de type CM (physico-chimique) impose la mesure de la concentration en un élément caractéristique de l'eau minérale naturelle étudiée au moyen d'un appareil à chromatographie ionique une fois par trimestre. L'eau minérale de Dax est une eau sulfatée calcique magnésienne et légèrement sodique ($[SO_4^{2-}] = 376.79 \text{ mg/L}$, $[Ca^{2+}] = 127.65 \text{ mg/L}$, $[Mg^{2+}] = 32.80 \text{ mg/L}$, $[Na^+] = 118.10 \text{ mg/L}$).

En outre, les analyses de balance ionique nous permettront de savoir si le profil physico-chimique de l'eau est altéré par son passage dans le réseau. Il est en effet possible que les canalisations en cuivre relarguent des ions $[Cu^{2+}]$. L'augmentation de la concentration de ces ions pouvant avoir un effet sur le développement bactérien, nous effectuerons régulièrement des analyses physico-chimiques de l'eau minérale naturelle (en particulier au niveau de l'eau en amont et en aval des canalisations à tester).

De la même manière, nous pourrons ainsi déterminer si la technique de désinfection par filtration entraîne une modification de la composition physico-chimique de l'eau minérale naturelle.

Les manipulations sur ce type d'appareil seront effectuées par un technicien de laboratoire habilité.

6.3. Spectromètre à flamme et à four Zeeman et spectromètre à flamme

Nous disposons de tels appareils pour la recherche d'éléments trace dans l'eau. Ils seront utilisés pour mesurer la concentration d'éléments relargués par certains types de canalisations (trihalométhanes ayant pour origine la dégradation du PVC-C par exemple [12]).

6.4. Microscope à fluorescence

La recherche de légionelles dans l'eau selon la norme T90-431[3] impose l'identification de l'espèce *Legionella pneumophila* par immunofluorescence, au moyen d'un anti-sérum anti-legionella marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Les bacilles fluorescents en présence de l'anti-sérum sont considérés comme étant des *Legionella pneumophila*.

Cette observation doit se faire au moyen d'un microscope à fluorescence, disponible au laboratoire (lampe à vapeur de Hg 100 W, filtres d'excitation 430 et 490 nm, filtre d'arrêt à 515 nm, miroirs diviseurs dichroïques : filtres de coupure 510 nm, grossissement x 1000).

L'ensemble du personnel de l'Institut du thermalisme est habilité à manipuler ce matériel.

6.5. Matériel supplémentaire

En plus de ce matériel, l'Institut dispose des appareils classiques nécessaires aux analyses microbiologiques : 3 postes de sécurité microbiologique ; cinq étuves (dont une étuve réfrigérée programmable à 20°C) ; compteur de colonies ; microscopes classiques ; autoclave (pour la stérilisation du matériel) ; rampes de filtration de l'eau ; pH-mètres ; bains à ultrasons ; consommable et verrerie nécessaires à un laboratoire d'analyses microbiologiques.

6.6. Compétences scientifiques de l'équipe

L'institut du thermalisme, comme l'indique son nom, a pour missions la recherche, la formation et la documentation concernant le thermalisme. De ce fait, les personnes qui travaillent au sein de cet organisme proviennent d'horizons divers et variés permettant d'aborder les différents aspects de cette thématique : médecins, pharmaciens, hydrauliciens aux compétences en hydrologie et microbiologie.

En ce qui concerne le projet présenté ici, la conception du pilote «eau thermale» a d'abord fait appel à des connaissances en matière d'hydraulique. Les membres de notre équipe, compétents dans ce domaine (C NGuyen Ba, Professeur des Universités, UFR de Pharmacie de l'Université Bordeaux 2 ; K Dubourg, Ingénieur d'Étude, Docteur en Pharmacie ; E Lacouture, Professeur certifié en hydrologie), ont donc travaillé sur le projet accompagnés de professionnels de cabinets d'expertise.

Les recherches qui vont être effectuées nécessiteront la réalisation d'un grand nombre d'analyses microbiologiques. En plus d'un poste de jeune chercheur en microbiologie (Sophie Pécastaings, DEA de Biologie-Santé) et d'ingénieur d'études (Karine Dubourg),

l'Institut dispose d'un poste de technicien de laboratoire (issu de Licence professionnelle "Technologie et Gestion des Eaux de Santé" de l'Institut du thermalisme) spécialisé dans les analyses microbiologiques et physico-chimiques de l'eau et la recherche de légionelles.

Enfin, les épisodes de désinfections et l'amélioration des protocoles seront effectués et validés par un pharmacien hygiéniste (Karine Dubourg).

7. Rapport et publication(s)

La rédaction du rapport final d'étude sera réalisée sous la forme d'un ou plusieurs articles scientifiques qui seront soumis pour publication à une revue internationale (Water Research ou Water Science and Technology).

L'article sera préparé par l'un des co-investigateur de l'étude (S Pécastains), qui en sera le premier auteur, sous la direction de C NGuyen Ba qui sera le dernier auteur.

La publication fera apparaître le soutien des promoteurs (K Dubourg), des consultants (M Capdepu, C Ohayon-Courtes) et des autres institutions ou personnes ayant contribué au financement de l'étude.

Références bibliographiques

1. 2000. Circulaire DGSNS 4 n° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux, vol. MESP0030267C.
2. 1999. Dénombrement des micro-organismes revivifiables, EN ISO 6222, vol. T 90-401.
3. 1993. Recherche et dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila*, T 90-431.
4. 1993. Recherche et dénombrement de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (Clostridia), NF EN 26461-1, ISO 6461-1, vol. T90-434.
5. 1993. Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*, NF EN 12780.
6. 2000. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux, NF EN ISO 7899-2, vol. T 90-416.
7. 2000. Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes, NF EN ISO 9308-1, vol. T 90-414.
8. Biurrun A, Caballero L, Pelaz C, Leon E, Gago A. Treatment of a *Legionella pneumophila*-colonized water distribution system using copper-silver ionization and continuous chlorination. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:426-8.
9. Buswell C M, Herlihy YM, Lawrence LM, McGuiggan JT, Marsh PD, Keevil CW, Leach SA. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:733-41.
10. ECOMICTH, 2004. Écologie et maîtrise de légionelles et autres pathogènes opportunistes dans les réseaux d'eaux chaudes et thermales.
11. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease : 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-26.
12. KCW Chan, DSM, and JA Brereton. Trihalomethane formation in drinking water and production within a polyvinyl chloride environment. *J Environ Eng Sci/Rev gen sci env* 2002;1:293-302.

13. Kool JL, Carpenter JC, Fields BS. Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *Lancet* 1999;353:272-7.
14. Lehtola MJ, Miettinen IT, Keinanen MM, Kekki TK, Laine O, Hirvonen A, Vartiainen T, Martikainen PJ. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res* 2004;38:3769-79.
15. Mead PB, Lawson JM, Patterson JW. Chlorination of water supplies to control *Legionella* may corrode the pipes. *JAMA* 1988;260:2216.
16. Muraca P, Stout JE, Yu VL. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:447-53.
17. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1585-92.
18. Srinivasan A, Bova G, Ross T, Mackie K, Paquette N, Merz W, Perl TM. A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:575-9.
19. Walker JT, Rogers J, Keevil CW. An investigation of the efficacy of a bromine containing biocide on an aquatic consortium of planktonic and biofilm micro-organisms including *Legionella pneumophila*. *Biofouling Chur Switzerland* 1994;8(1):47-54.