

Valutazione dell'efficacia dell'Anolyte nel controllo microbiologico nei sistemi di torri di raffreddamento industriali.

E. L. Prince, A. v. G. Muir, W. M. Thomas, R. J. Stollard, M. Sampson and J. A. Lewis

Riassunto:

Per valutare l'efficacia dell'Anolyte, un biocida basato su acqua elettroattivata, contro la Legionella ed i batteri eterotrofi in due sistemi di torri di raffreddamento industriali, si è impiegato protocollo di campionamento globale. Entrambe le torri oggetto della valutazione sono rimaste esenti da evidenze di contaminazione da Legionella spp per tutti i cinque mesi della valutazione, nonostante fosse stata dimostrata precedentemente la presenza di Legionella in una delle torri testate, e in due altre torri nella stessa struttura, a livelli ben eccedenti i limiti superiori di azione dell'UK Health and Safety Commission (HSC) Approved Code of Practice and Guidance (ACOP). Si sono riscontrati livelli di batteri eterotrofi al di sotto 10+ ufc/mL in entrambe le torri per la maggior parte del periodo della prova.

I risultati hanno anche fornito una prova indiretta della significativa attività contro i batteri del biofilm, la cui rimozione è iniziata immediatamente dopo il dosaggio di Anolyte. I risultati sono particolarmente incoraggianti, poiché le due torri analizzate hanno una lunga storia di scarso controllo microbiologico, ottenuto utilizzando prodotti biocidi convenzionali a base di bromine. Sono state osservate significative differenze tra i valori di conta totale dei batteri ottenuti in laboratorio sui frequenti campioni di liquido e quelli ottenuti seguendo il metodo raccomandato dal HSC con il vetrino immerso.

Introduzione:

La malattia del Legionario, causato dal batterio Legionella pneumophila, è una forma severa di polmonite. In diverse epidemie ospedaliere, si è pensato che i pazienti fossero stati esposti ad aerosol contaminati prodotti dalle torri di raffreddamento. La Legionella residente all'interno del biofilm rappresenta un problema soprattutto nei sistemi di raffreddamento a torri, e può rivelarsi difficile da eradicare con i mezzi convenzionali. LeChevalier et al. registra che nel biofilm i batteri possono essere sino a 3000 volte più resistenti ai normali disinfettanti al cloro di quelli distaccati. Bradford and Baker e Crayton et al. hanno dimostrato una miscela di ossidanti, per contro, esercita un'elevatissima attività di contrasto al biofilm. L'Anolyte è una soluzione acquosa di ossidanti miscelati, generata in situ dall'elettrolisi di una soluzione salina diluita in una cella elettrochimica brevettata.

L'Anolyte ha una tossicità estremamente bassa, insieme ad un'attività biocida ad ampio spettro ben documentata. Zinkevich et al. riferisce che la modalità di azione comporta la distruzione di DNA cromosomico e plasmidico, di RNA e proteine, e studi preliminari indicano che questo fornisce una buona penetrazione ed un controllo di biofilm batterici. L'Anolyte ha una storia di circa tre anni di utilizzo nel trattamento delle torri di raffreddamento, e da allora sono stati ottenuti risultati soddisfacenti soddisfacendo i protocolli di monitoraggio dell'UK Health and Safety Commission (HSC) Approved Code of Practice and Guidance (ACOP), con test continuamente negativi per la Legionella spp.

L'Anolyte ha dimostrato una rapida efficacia biocida contro i batteri della Legionella nel test europeo di sospensione standard EX 1362. Si è pertanto utilizzato un sistema di campionamento globale per valutare l'efficacia dell'Anolyte nei confronti della Legionella spp. e dei batteri eterotrofi in due sistemi industriali di torri di raffreddamento.

I limiti d'azione dello HSC per le torri di raffreddamento definisce una Conta Batterica Totale C.B.T. inferiore a $10\log_4/\text{ml}$ ed una conta di Legionella spp. inferiore a 100/ml quali indicatori che un sistema di raffreddamento è microbiologicamente sotto controllo. Una C.B.T. tra $10\log_4$ e $10\log_5/\text{ml}$ e/o una conta di legionella fino a 103/ml richiede che siano riviste le misure di controllo, mentre una C.B.T. maggiore di $10\log_5/\text{ml}$ e/o legionella superiore a 103/ml impone un'immediata azione correttiva. Lo HSC afferma anche che i residui di ossidanti non devono coerentemente eccedere i 2ppm in modo da evitare problemi di corrosione, sebbene livelli eccedenti siano permessi in circostanze eccezionali. Le raccomandazioni dello HSC per il monitoraggio microbiologico specificano l'analisi settimanale di un singolo campione per la C.B.T. in acqua di raffreddamento mediante l'immersione della piastrina, con un monitoraggio dell'acqua di reintegro trimestrale, da eseguire con le analisi trimestrali per la Legionella spp. di un singolo campione di acqua di raffreddamento, attraverso un laboratorio accreditato dallo United Kingdom Accreditation Service (LKAS). Questi parametri sono stati pertanto utilizzati come benchmark nel presente studio, eccetto il fatto che lo studio ha notevolmente aumentato gli scopi e la frequenza dell'analisi. Bentham riferisce che la variabilità della conta della Legionella in torre di raffreddamento è così elevata che la valutazione del rischio non può essere affidabilmente identificata con analisi singole o infrequenti. La concentrazione di Legionella spp. può variare di più di tre ordini di magnitudine in 10 min. Inoltre, sebbene la conta settimanale del C.B.T. dell'acqua di raffreddamento sia specificata dallo HSC quale mezzo di valutazione del controllo microbiologico, una serie di studi ha dimostrato che non esiste prova di correlazione tra C.B.T. e presenza di Legionellae nelle torri di raffreddamento.

Le torri di raffreddamento comprendono nicchie ecologiche complesse, ed anche torri diverse di identico progetto o modello in un sito unico si comportano microbiologicamente in maniera diversa. Questo era il caso del terreno di prova, come dimostrato dalle registrazioni storiche dello HSC ACOP, che è stato attentamente considerato nella progettazione di questo studio. Le torri selezionate per lo studio sono state scelte perché avevano una lunga storia di scarso controllo microbiologico usando bromo, ma i dati da altre torri in loco di identico disegno, anche se sotto analogo controllo, non era abbastanza comparabile da giustificare l'uso di esse come controllo delle torri in prova, e si è quindi considerato che un monitoraggio pre-processuale delle torri da testare avrebbe fornito i dati di controllo più appropriati in queste circostanze.

Materiali e Metodi:

Luogo della prova e torri

Entrambe le torri della prova sono situate in un importante sito produttivo del Regno Unito. Prima del dosaggio di Anolyte, entrambe erano state trattate con bromo, sotto forma di bromodichlorohydantoin, a livelli tipicamente da 0.5 a 2 ppm, ma con episodi periodici nei quali ha raggiunto il dosaggio di 3-5 ppm, con un potenziale di corrosione superiore a norme industriali accettabili. La Torre 1 forniva il raffreddamento diretto ad un compressore

frigorifero e consisteva in una torre a spruzzo di struttura metallica senza flusso d'aria assistito meccanicamente. Il reintegro era eseguito con acqua potabile della rete.

La Torre 2 forniva il raffreddamento diretto a uno scambiatore di calore a piastre ed era costituita da una coppia di torri a raffreddamento indotto costruite in fibreglass. L'acqua di reintegro per questa torre proveniva da un fonte non potabile di basso livello.

Trattamento:

Le Torri 1 e 2 sono state trattate dosando Anolyte, con dosaggio controllato tramite sonde Redox in linea Sentek, con un valore Redox impostato a 580mV. L'acqua potabile della rete alimentava il generatore di Anolyte per la diluizione salina, mentre nel caso della Torre 2 era inizialmente disponibile per questo scopo solo acqua di reintegro non potabile con durezza pari a 120-360 ppm di CaCO₃. Ciò ha causato problemi operativi al generatore di Anolyte, dovuti all'insudiciamento fisico delle camere elettrolitiche. È stato quindi installato un nuovo collegamento all'acqua potabile per alimentare la soluzione salina, anche se il reintegro della torre ha continuato ad essere fornito dalla fonte non potabile originale.

Le Torri 1 e 2 sono state svuotate e disinfettate, anche se non pulite manualmente, nell'Agosto 2000, più di quattro mesi prima dell'attivazione del dosaggio con Anolyte. Il monitoraggio pre-processuale delle torri è iniziato l'1 novembre 2000 (giorno 1), 58 giorni prima di mettere in Servizio il dosaggio di Anolyte, mentre le torri erano ancora in trattamento con bromo. Il dosaggio di Anolyte è iniziato il 28 dicembre 2000 (giorno 58) e il controllo è proseguito sino al 25 maggio 2001 (giorno 206), quando le torri sono state di nuovo pulite e clorate secondo le raccomandazioni del HSC. Durante il processo, oltre al dosaggio di bromo o Anolyte, in ogni torre sono stati anche somministrati ogni 1° del mese 50ppm di principio attivo biocida non ossidante isotiazolone, mantenendo questa concentrazione per un minimo di 4 ore, in conformità con le raccomandazioni HSC ACOP.

Analisi chimiche e microbiologiche:

Le torri sono state campionate settimanalmente durante il periodo di monitoraggio pre-processuale, e due volte la settimana in seguito, prendendo dal bacino volumi di 1 L in recipienti sterili contenenti sodio tiosolfato sufficiente a portare la concentrazione finale a 1% (v/v). Campioni separati di 1 L. sono stati prelevati per le analisi della Legionella spp. e C.B.T., e questa procedura di campionamento era ripetuta dopo 10 min., fornendo campioni in doppio sia per le analisi della Legionella sia della C.B.T. I campioni venivano mantenuti a 4°C durante il trasporto al laboratorio e consegnati il giorno della raccolta. Tutte le analisi microbiologiche dei campioni di acqua sono state svolte da un laboratorio accreditato da UKAS, facente parte del Public Health Laboratory Service Water Microbiology External Quality Assessment Scheme.

Le analisi per la Legionella sono state realizzate usando il metodo di filtrazione a membrana specificato con BS 6068-4.12.1998 con un limite inferiore di rilevazione di 100 ufc/L, e i positivi alla *L. pneumophila* sono stati sierotipizzati. Le analisi C.B.T. per gli eterotrofi sono state svolte versando diluizioni appropriate in piatti con agar (Oxoid) ed incubandoli a 30°C per tre giorni.

Campioni d'acqua di raffreddamento per le analisi chimiche sono stati raccolti periodicamente, e la riserva di ossidanti è stata determinata con il metodo N-N-dietil-p-phenilene-diammina (DPD).

Acqua di reintegro della Torre2:

Dal giorno 94 in poi, sono stati presi settimanalmente anche singoli campioni dell'acqua non potabile che ha alimentato il generatore di Anolyte della Torre 2 sino al giorno 121, e che forniva l'acqua di reintegro alla torre durante tutta la prova. Essi sono stati analizzati per C.B.T. e Legionella spp., utilizzando la metodologia di cui sopra.

Metodologia Dip-slide:

Singoli campioni dip-slide (OXOID, DS147A) per entrambe le torri sono stati presi due volte a settimana dal bacino, seguendo le istruzioni del fabbricante. Tutte le piastrelle a immersione sono state incubate per 48 h a 30°C.

Risultati:

Analisi per Legionella spp.

Il siero gruppo 2-14 di *L. pneumophila* è stato isolato dalla Torre 2 a un livello di 150 ufc/l due settimane prima dell'inizio della valutazione preliminare, nel corso della routine di monitoraggio dello HSC ACOP, mentre la torre era ancora sottoposta al trattamento con bromo. Il monitoraggio HSC ACOP ha anche rilevato Legionella spp. a un livello di 1900 ufc/L, e *L. pneumophila* siero gruppo 2-14 a livello di 4000 ufc/l in altre due torri nello stesso sito, rispettivamente nella prima e nella seconda settimana del monitoraggio preliminare allo studio con Anolyte. Nessun batterio di legionella è stato rilevato in una delle torri trattate con Anolyte durante i cinque mesi di durata di questo studio.

Conta Batterica Totale

Per tutto gennaio, la conta totale C.B.T. della torre 1 variava, e sono state osservate ampie e considerevoli differenze tra due campioni presi a distanza di 10 min uno dall'altro. Tre campioni mostravano una conta superiore a $10 \log_4$ ufc/L, ma il doppiante di questi presentava una conta di meno di $10 \log_2$ ufc/L in un caso e di meno di $10 \log_1$ negli altri due.

Una tale elevata variabilità indica un distribuzione discontinua dei batteri all'interno dell'acqua di raffreddamento e fluttuazioni di queste dimensioni in breve periodo di tempo sono coerenti con il rilascio del biofilm, fornendo a intermittenza una conta elevata su uno sfondo generalmente inferiore.

Fin dall'inizio di febbraio (giorno 93), la C.B.T. ha mostrato una consistente tendenza al ribasso e dall'inizio di marzo sino all'inizio di aprile (giorni 121-152) le conte più alte sono state nell'ordine di $10 \log_2$, con i conteggi più bassi frequentemente pari a zero. Dai primi di aprile sino al termine dei trattamenti con Anolyte, valori intermittenti di C.B.T. sono stati registrati superiori a $10 \log_3$, ma nessuno eccedente $10 \log_4$, mentre la maggior parte delle conte più basse era pari di nuovo a zero.

I risultati delle analisi dip-slide della Torre 1 mostravano costantemente conte microbiche più basse dei dati di C.B.T. dello studio, con un 83,9% di conteggi inferiori ad entrambe le rilevazioni C.B.T. del medesimo giorno e nel 96,8% dei casi più bassa della più alta delle due.

I risultati della Torre 2 registrati prima del trattamento con Anolyte variavano tra $10 \log_3$ e $10 \log_7$, con una quota significativa a oltre $10 \log_4$. Dall'inizio del dosaggio di Anolyte sino all'inizio di marzo (giorno 58-121), la C.B.T. variava tra $10 \log_2$ e $10 \log_6$, a parte un singolo campione indicante una conta di zero ed un altro superiore a $10 \log_6$. Una parte significativa dei campioni si colloca al di sopra di $10 \log_5$. Dopo l'installazione della fornitura di acqua potabile al generatore di Anolyte all'inizio di marzo, si è avuta un'immediata e notevole riduzione della C.B.T., che è crollata a livelli inferiori a $10 \log_3$, è così è rimasta per tutto il resto del trattamento con Anolyte, a parte due occasioni in cui la conta ha raggiunto $10 \log_4$.

Le piastrine dip-slide della Torre 2 mostravano che il 62,3% dei conteggi erano inferiori ad entrambe le conte del medesimo giorno, con il 69,8 più basso del più alto dei due C.B.T. La figura 3 mostra i C.B.T. dell'acqua non potabile che riforniva il sistema Anolyte della torre 2 sino al marzo, (giorni 121), e che reintegrava l'acqua nella Torre 2 per tutto il periodo della sperimentazione con Anolyte. La conta variava tra $10 \log_1$ e più di $10 \log_5$, con una quota significativa di oltre $10 \log_4$.

Effetto dell'Isotiazolone:

Nessuna evidenza di significativa riduzione della C.B.T. è apparsa in alcuna delle torri come conseguenza dell'aggiunta mensile di biocida non ossidante isotiazolone.

Riserva di ossidante:

La riserva di ossidanti liberi in entrambe le torri variava tra 0,3 e 1,8 ppm, con la maggior parte dei risultati che si ponevano fra 0,3 e 1,0 ppm.

Discussione:

La maggior parte degli studi delle misure di controllo microbiologico nei sistemi di raffreddamento a torre impiegano un protocollo di campionamento minimalista, solitamente sulla base delle raccomandazioni HSC ACOP per la sorveglianza di routine della qualità microbiologica nei sistemi di raffreddamento, che secondo Bentham è improbabile che produca risultati di grande valore scientifico.

Il regime di campionamento utilizzato nel presente studio, invece, fornisce una gamma completa di dati replicati, che facilita significative conclusioni assai più di quanto normalmente sarebbe il caso di ottenere.

Data la natura del regime di campionamento utilizzato, l'assenza di legionella da una qualsiasi delle torri sottoposte alla sperimentazione con l'Anolyte è un dato significativo, in particolare quando la Torre 2 ha fornito la prova della colonizzazione di legionella nel periodo pre-sperimentazione. Bentham e Fliermans riferiscono che una coltura di Legionella spp positiva in qualsiasi momento indica che un sistema è contaminato, a prescindere dai risultati della coltura successiva, e che una volta che colonizzazione si è verificata, la legionella non può essere eliminata dai sistemi di raffreddamento a torre. Entrambi gli autori ritengono che si dovrebbe porre l'accento sul controllo, anziché sull'eradicazione, della legionella, e suggeriscono che questo può essere ottenuto attraverso criteri di controllo appropriati, compresa la scelta dei biocidi e dei metodi di dosaggio del biocida. Batteri di Legionella sono stati isolati anche da altre due torri, a livelli ben al di sopra dei limiti superiori dello HSC ACOP, dimostrando così che la legionella era presente sul posto all'inizio del periodo di studio. I risultati del presente studio, pertanto sostengono quelli di precedenti studi di laboratorio, e forniscono ulteriori prove dell'efficacia dell'Anolyte nel controllo della legionella nei sistemi di raffreddamento a torre.

I risultati della C.B.T. hanno mostrato un modello coerente di elevati conteggi e alta variabilità immediatamente dopo la somministrazione di Anolyte, seguito da un calo ai livelli di base inferiori con sporadici conteggi individuali superiori. Ciò è coerente con la rimozione del biofilm, conseguenza della messa in azione dell'Anolyte, sostenendo la tesi di altri operatori secondo i quali le soluzioni di ossidanti misti sono particolarmente efficaci nella rimozione del biofilm. Inoltre, le torri non erano state sottoposte a una pulizia manuale completa prima dell'inizio del processo, ed il sistema Anolyte ha quindi ottenuto buoni risultati a fronte di una sfida significativa. I risultati ottenuti con la Torre 2 sono stati particolarmente degni di nota, dal momento che questa torre ha rappresentato una sfida severa per ogni sistema di controllo/trattamento a causa della costante carica biologica presente nell'acqua di reintegro.

I risultati della C.B.T. illustrano il valore del duplicato di campionamento, in quanto emerge un livello di variabilità tra i campioni prelevati a distanza di 10 min che sarebbe passata inosservata usando un protocollo meno rigoroso, con una concomitante riduzione del potenziale di significatività dei dati ottenuti. Il confronto tra le tecniche di

campionamento mostra che la conta con dip-slide della Torre 1 è stata generalmente inferiore di 10-100 volte dei corrispondenti risultati C.B.T. Anche i dati della Torre 2 mostrano che la conta dip-slide ha prodotto valori generalmente inferiori. Questi risultati dimostrano che mentre il metodo dip-slide può essere utilizzato per misurare il trend di crescita microbica di base all'interno di un sistema di raffreddamento a torri, esso non costituisce un sostituto per uno studio quantitativo di laboratorio basato sulla C.B.T.

I risultati di questo studio dimostrano chiaramente che Anolyte è una valida alternativa ai tradizionali prodotti a base di bromo per il trattamento degli impianti di raffreddamento a torre. La conta batterica verificata in tutte le torri controllate nel corso dello studio è apparsa ben entro i limiti HSC ACOP, con le riserve di ossidante libero che si sono mantenute entro i limiti raccomandati durante per tutto il periodo dello studio. Ulteriori conferme di questi risultati avrebbero potuto, forse, essere fornite da uno studio incrociato, ma in un contesto commerciale questa impostazione non era consentita, poiché una volta dimostrata la superiorità del sistema Anolyte nei confronti del bromo, considerazioni di tipo sanitario e di sicurezza vietano effettivamente un ritorno al bromo.