



Gestion des biofilms, enjeux industriels – Romainville – 13 octobre 2011

# Problématiques liées à la bioadhésion en IAA

Florence POSTOLLEC<sup>1</sup>,

AG Mathot<sup>2</sup>, F Baron<sup>3</sup>, S Jan<sup>3</sup>, H Freulon<sup>4</sup>, C Hermon<sup>5</sup>





[www.adria.tm.fr](http://www.adria.tm.fr)



## Des solutions sur-mesure pour les IAA et leurs fournisseurs

*Innovier, démontrer, transférer pour améliorer votre compétitivité*

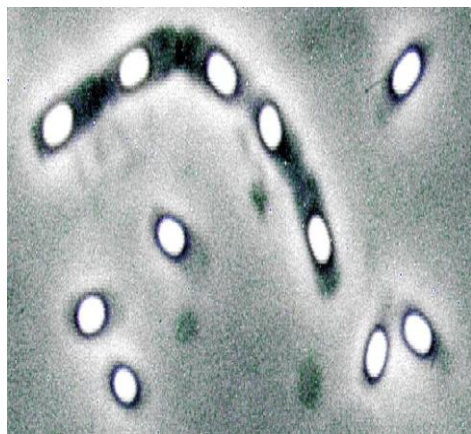
Les chercheurs et ingénieurs de l'ADRIA coordonnent de nombreux programmes R&D et actions de transfert pour développer l'aliment de demain, en collaboration avec les inter-professions des IAA et organismes internationaux

- ☑ **Prestations** pour optimiser & contrôler la durée de vie des produits, améliorer les formulations et procédés de fabrication, développer & valider de nouvelles méthodes d'analyses, préserver et promouvoir les qualités nutritionnelles des produits
- ☑ **Formations & audits** sur la sécurité des aliments, formulation, procédés et technologies alimentaires, management et outils de productions



## Problématique IAA

- ❑ Contamination ponctuelle de *Bacillus weihenstephanensis* au niveau de certaines filières industrielles.
- Campagnes d'échantillonnage pour déterminer la prévalence et l'état des lieux des contaminations des bactéries sporulées
- ☑ Faible contamination en bactéries sporulées au niveau des surfaces, matières premières, produits intermédiaires et produits finis
- ☑ Identification de *B. weihenstephanensis* au niveau des surfaces et notamment au niveau de la zone déballage et transfert



- ☑ Souches ayant une variabilité saisonnière importante
- ☑ Aucun lien entre une contamination croisée surface/produit n'est mis en évidence
- ☑ Aucune contamination n'est mise en évidence dans les produits



## Objectifs

### Comment expliquer la persistance de *B. weihenstephanensis* dans l'environnement industriel ??

- I. Analyse de la flore en présence dans la matrice ayant des capacités d'adhésion aux surfaces inox
- II. Caractérisation du pouvoir d'adhésion de *B. weihenstephanensis* aux surfaces inox, en conditions dynamiques
- III. Approches complémentaires abordées au sein des réseaux
  - Standardisation des protocoles d'adhésion/décrochage des flores au niveau des surfaces
  - Evaluation de l'activité des biocides
  - Outil d'aide à la décision pour la simulation de l'inactivation bactérienne et l'optimisation des procédures de sanitation NEP



## Approche en pilote de laboratoire

- Mise en place d'outil pour l'étude de l'adhésion microbienne aux surfaces fermées, en mode dynamique
- Circulation en boucle de matrice alimentaire liquide dans des tuyaux en inox pour simuler l'adhésion aux surfaces fermées industrielles



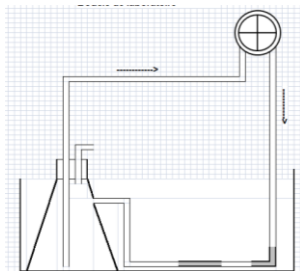
- Pilote de laboratoire: Ø int. 8.0 mm, étude matrice artificiellement contaminée
  - Pilote semi-industriel: Ø int. 35.5 mm, étude de matrice IAA
- Tuyaux et coupons inox
  - Conditions contrôlées (température et débit industriels)
  - Evaluer l'inactivation non thermique de *Bacillus*



## Matériels & Méthodes

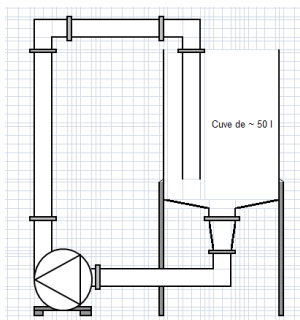
### □ Mise en place d'outil pour l'étude de l'adhésion microbienne aux surfaces fermées, en mode dynamique

#### - Pilote de laboratoire: $\varnothing$ int. 8.0 mm, 4°C



- volume de travail: 500ml
- surface d'étude: 2 faces de 5cm<sup>2</sup>
- vitesse linéaire: 150ml/min (Re200), 2050ml/min
- matrice alimentaire +/- diluée
- inoculation : matrice artificiellement inoculée par *B. weihenstephanensis* (spores & cellules)

#### - Pilote semi-industriel: $\varnothing$ ext./ $\varnothing$ int. : 38mm/35.5mm, 10°C



- volume de travail: 40L
- surface d'étude: 2 faces de 25cm<sup>2</sup>
- débit massique: 3 000 kg/h
- vitesse linéaire: 50m/min
- matrice diluée
- coupon/surface insérée aux raccords SMS38
- inoculation de la boucle par surfaces IAA



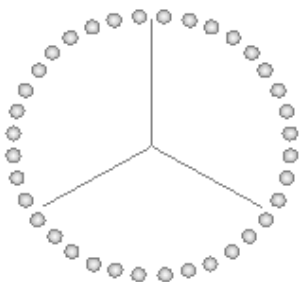
- Méthode “culture-dépendante”
  - Quantification de la flore recouvrable sur gélose :
    - Aérobie et anaérobie
    - Incubation à 4°C, 30°C, 55°C
    - Gélose (BHI-YE, PCA, RCM, GSP, Mossel)
  - Identification de la flore recouvrable sur gélose :
    - Séquençage de l'ADNr16S et comparaison aux bases de données internationales



## Matériels & Méthodes

- Méthode "culture-indépendante"
  - Identification de la flore en présence :
    - Clonage de produit PCR
    - Séquençage de l'ADNr16S et identification
  - Détection et identification de la flore sporulée après enrichissement : GeneDisc

24h



- analysis of 3  
samples in parallel -

### GeneDisc1: « Genus »

- Bacillus*
- Paenibacillus*
- Alicyclobacillus*
- Geobacillus stearothermophilus*
- Anoxybacillus flavithermus*
- Moorella*
- Clostridium*

### GeneDisc2: « *Bacillus* spp. »

- Bacillus*
- B. cereus* / *B. thuringiensis*
- B. weihenstephanensis* / *B. mycoides*
- B. licheniformis*
- B. pumilus*
- B. sporothermodurans*
- B. subtilis*
- Brevibacillus laterosporus*





## Matériels & Méthodes

- Analyse de la flore présente dans la matrice ayant des capacités d'adhésion aux surfaces inox
  - Circulation en boucle de la matrice fraîche en conditions industrielles (9j)



T (°C)	matrice	Air ambient	Eau refroidissement
moyenne	8.9	15.5	1.2
Ecart type	1.5	0.8	0.7

Temps de fonctionnement: 211 heures

Débit massique: 3000 kg/h

Vitesse linéaire: 50m/min

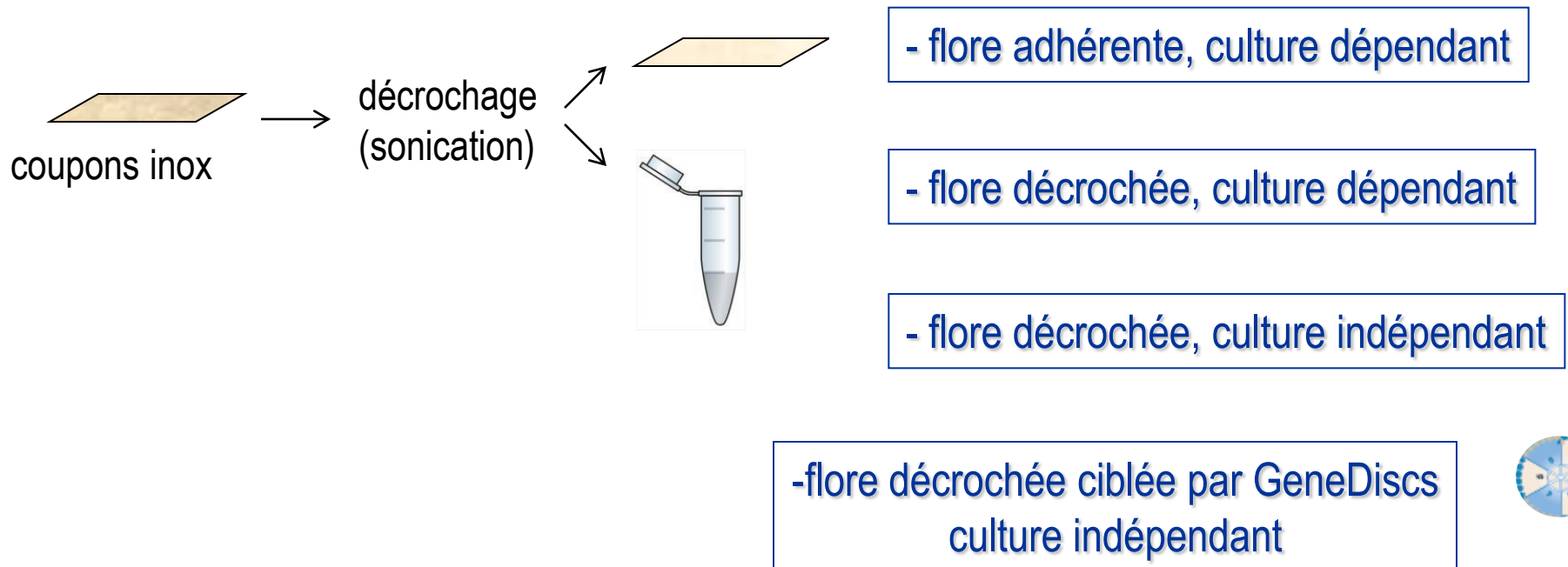
Diamètre tuyauterie ( $\varnothing$  ext./  $\varnothing$  int.): 38mm / 35.5 mm

Matrice diluée à 20%



## Matériels & Méthodes

- Analyse de la flore présente dans la matrice ayant des capacités d'adhésion aux surfaces inox
  - Circulation en boucle de la matrice fraîche en conditions industrielles (9j)
  - Prélèvement et analyse des surfaces





## Résultats

### Analyse de la flore adhéree

- Analyse de la flore présente dans la matrice ayant des capacités d'adhésion aux surfaces inox
  - matrice fraiche en circulation:
    - flore psychrotrophe et mésophile aérobie facultative,
    - identification de la flore majoritaire: *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*
    - présence de spore *Bacillus spp.*, après 6j de circulation



## Résultats

### Analyse de la flore adhéree

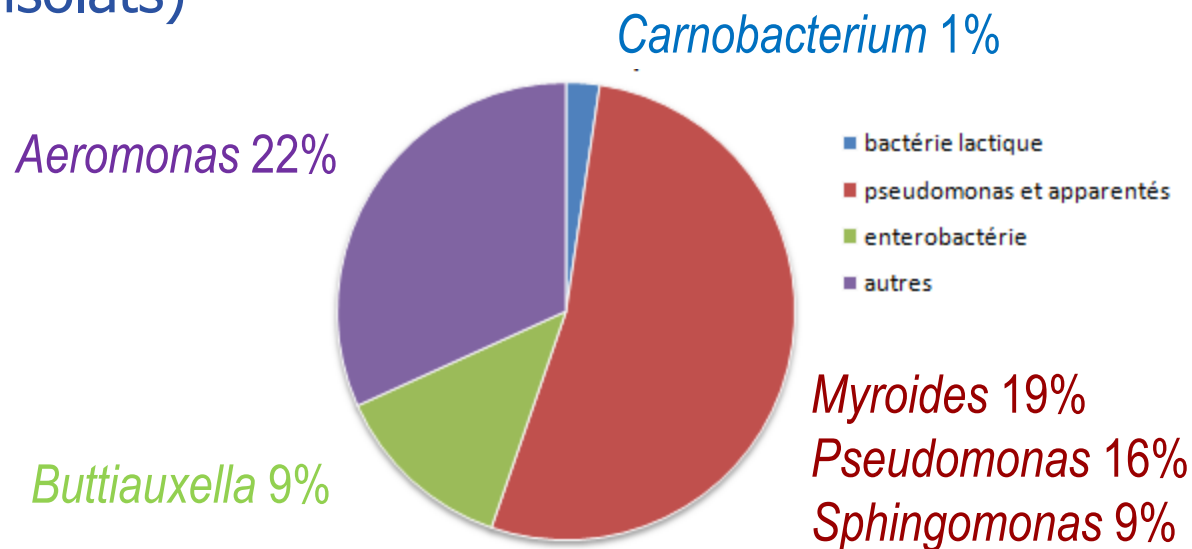
- Analyse de la flore présente dans la matrice ayant des capacités d'adhésion aux surfaces inox
  - Flore décrochée des surfaces inox après 9j: quantification
    - Adhésion équivalente de la flore psychrotrophe et mésophile aérobie facultative... mais peu de spore !!!
    - Flore décrochée des sections est 2 à 10x+ importante qu'au niveau des coupons, notamment FAM



# Résultats

## Analyse de la flore adhéree

- Analyse de la flore présente dans la matrice ayant des capacités d'adhésion aux surfaces inox
  - Flore décrochée des surfaces inox après 9j: biodiversité (85isolats)



- Flore majoritairement constituée de *Pseudomonas* et apparentées, reconnu pour leur fort pouvoir d'adhésion



## Conclusions

### Analyse de la flore adhéree

- Flore adhéree aux surfaces inox:
  - Flore adhérente après sonication, recouvrable sur gélose
    - Flore majoritairement constituée de *Pseudomonas* (21%), *Aeromonas* (18%) et *Acinetobacter* (15%)
  - Flore décrochée des surfaces inox, recouvrable sur gélose
    - Flore majoritairement constituée de *Pseudomonas* et apparentées (*Pseudomonas* 16%, *Aeromonas* 22%)
    - Peu de spore de *Bacillus spp.*
  - Flore décrochée des surfaces inox, "culture indépendante"
    - Forte présence de flore lactique (*Lactococcus*, *Carnobacterium*) et *Acinetobacter*, sous estimation les milieux utilisés
  - Flore décrochée des surfaces inox, "culture indépendante"
    - Détection de *B. weihenstephanensis*



## Résultats

### Capacité d'adhésion de *B. weihenstephanensis*

- Capacité d'adhésion aux surfaces inox des cellules
  - En mode statique après 20h d'adhésion
    - T° ambiante, milieu de culture: 5-7logCFU/cm<sup>2</sup> (croissance)
    - 4°C, matrice: 2-4logCFU/cm<sup>2</sup> (pas croissance)
  - En mode dynamique, en "boucle labo" à 4°C
    - après 2j, 3j et 7j: 2-3logCFU/cm<sup>2</sup> (pas croissance)
    - Pas de différence pour essais avec matrice +/- dilution
    - Pas de différence avec conditionnement préalable ou co-inoculation avec *Pseudomonas* ou *Aeromonas*, reconnus pour leur capacité d'adhésion
    - dans condition de l'étude la flore adhéree ne résiste à procédure de NEP → historique des surfaces et conditions d'écoulement
- Capacité d'adhésion aux surfaces inox des spores



## Conclusions des essais en pilote de laboratoire

- Pour la problématique industrielle étudiée
  - *Aeromonas*, *Myroides* et *Pseudomonas* sont des flores naturellement présentes dans la matrice et ayant de forte capacité d'adhésion aux surfaces
  - Faible capacité d'adhésion de *B. weihenstephanensis* aux surfaces inox ...
  - Néanmoins l'espèce est généralement détectée après enrichissement au niveau de la flore décrochée des surfaces!





## Perspectives du programme

- ☑ Analyse des capacités d'adhésion en pilote de laboratoire
- ☐ Prochaines étapes spécifiques des industriels concernés
  - Même approche après inoculation de la boucle pilote avec des surfaces industrielles
  - Caractérisation de la flore adhérente aux surfaces industrielles ayant la capacité de résister aux procédures de NEP utilisées
- ☐ Partenaires



- Animation des groupes d'industriels par H. Freulon, PAO

✉ [Henry.Freulon@agrocampus-ouest.fr](mailto:Henry.Freulon@agrocampus-ouest.fr)



## Autres réseaux

### □ Réseaux d'expertise sur la problématique



- **UMT 08.3 PHYSI'Opt**, Quimper  
Process alimentaires et Hygène des Surfaces: Impact sur la physiologie et le comportement bactérien pour l'Optimisation et la validation des Traitements

- institut technique: ADRIA
- laboratoire universitaire: LUBEM, UBO



## Autres réseaux

### □ Réseaux d'expertise sur la problématique



- **RMT CHLEAN,**  
Conception hygiénique des lignes & équipements et amélioration de la nettoyabilité
- 11 instituts techniques
- 7 centres d'enseignements & recherche

CONCEPTION HYGIÉNIQUE DES LIGNES & ÉQUIPEMENTS  
ET AMÉLIORATION DE LA NETTOYABILITÉ

## Partenaires

### ITAI



### Centre interface



### Centre technique



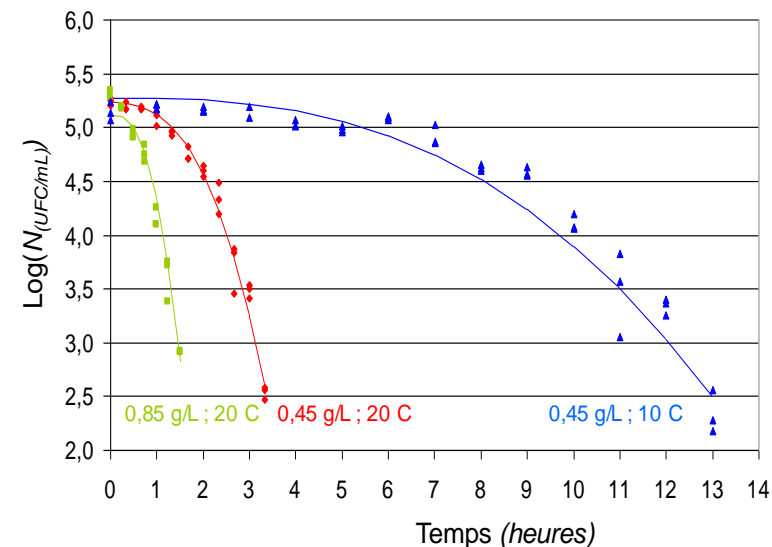
### Enseignement et recherche



- 3 groupes de travail
  - Action scientifique
    - Biocontaminations et interface matériaux-substrat
    - Conception hygiénique
    - Nettoyage et désinfection
  - Formation initiale et continue
  - Dissémination et outil "Wik'Hygénie"
  
- Coordination, C. Hermon, CTCPA
  - ✉ [CHERMON@ctcpa.org](mailto:CHERMON@ctcpa.org)

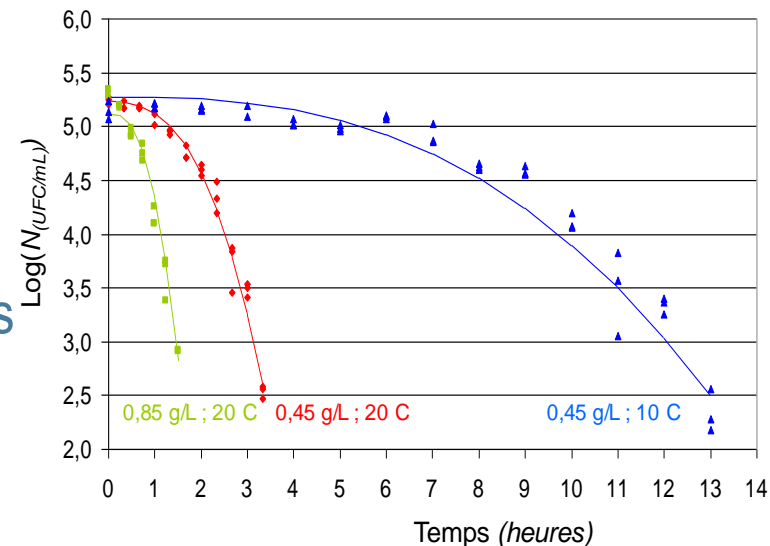
## UMT 08.3 PHYSI'Opt

- Utilisation de nouvelles approches, contribuant à améliorer les connaissances fondamentales et appliquées sur **l'impact des conditions environnementales** :
  - de sporulation sur la formation et la résistance des spores,
  - d'inactivation sur la résistance des cellules végétatives,
  - de sanitation sur la résistance des bactéries sporulées:
    - quantification de l'activité sporicide de l'acide peracétique sur des spores en suspension ou en gel



## UMT 08.3 PHYSI'Opt

- Utilisation de nouvelles approches, contribuant à améliorer les connaissances fondamentales et appliquées sur l'impact des conditions environnementales :
  - de sporulation sur la formation et la résistance des spores,
  - d'inactivation sur la résistance des cellules végétatives,
  - de sanitation sur la résistance des bactéries sporulées:
    - quantification de l'activité sporicide de l'acide peracétique sur des spores en suspension ou en gel
    - Utilisation de modèles mathématiques pour simuler l'inactivation bactérienne et optimiser les procédures de NEP



## UMT 08.3 PHYSI'Opt

Process alimentaires et Hygène des Surfaces: Impact sur la physiologie et le comportement bactérien pour l'Optimisation et la validation des Traitements



Coordinateurs & coordinateurs adjoints:



Ivan LEGUERINEL  
Louis COROLLER



Danièle SOHIER  
Florence POSTOLLEC

✉ [florence.postollec@adria.tm.fr](mailto:florence.postollec@adria.tm.fr)