



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

Problématiques liées à la bioadhésion en IAA

Florence POSTOLLEC¹,

AG Mathot², F Baron³, S Jan³, H Freulon⁴, C Hermon⁵





www.adria.tm.fr



Des solutions sur-mesure pour les IAA et leurs fournisseurs

Innovier, démontrer, transférer pour améliorer votre compétitivité

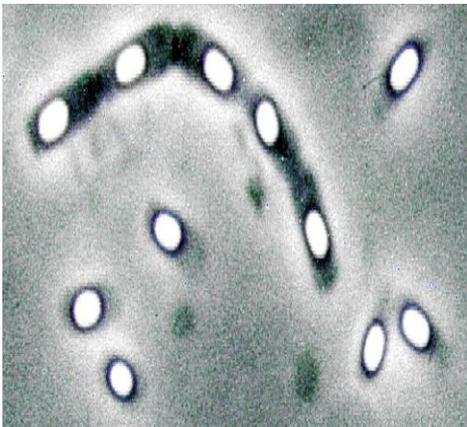
Les chercheurs et ingénieurs de l'ADRIA coordonnent de nombreux programmes R&D et actions de transfert pour développer l'aliment de demain, en collaboration avec les inter-professions des IAA et organismes internationaux

- ☑ **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



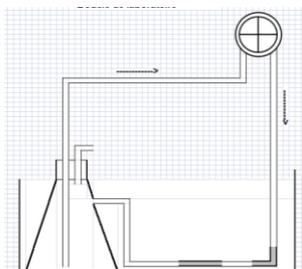
- Pilote de laboratoire: Ø int. 8.0 mm, étude matrice artificiellement contaminée
 - Pilote semi-industriel: Ø int. 35.5 mm, étude de matrice IAA
- Tuyaux et coupons inox
 - Conditions contrôlées (température et débit industriels)
 - Evaluer l'inactivation non thermique de *Bacillus*



Matériels & Méthodes

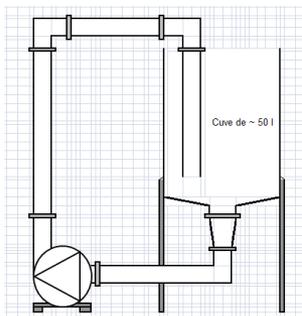
□ Mise en place d'outil pour l'étude de l'adhésion microbienne aux surfaces fermées, en mode dynamique

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



- volume de travail: 500ml
- surface d'étude: 2 faces de 5cm²
- 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 25cm²
- 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



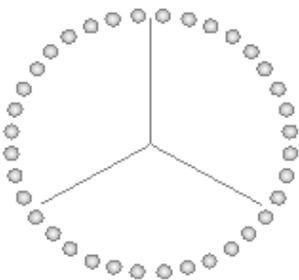
- Méthode “culture-dépendante”
 - Quantification de la flore recouvrable sur gélose :
 - Aérobie et anaérobie
 - Incubation à 4°C, 30°C, 55°C
 - Gélose (BHI-YE, PCA, RCM, GSP, Mossel)
 - Identification de la flore recouvrable sur gélose :
 - Séquençage de l'ADNr16S et comparaison aux bases de données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

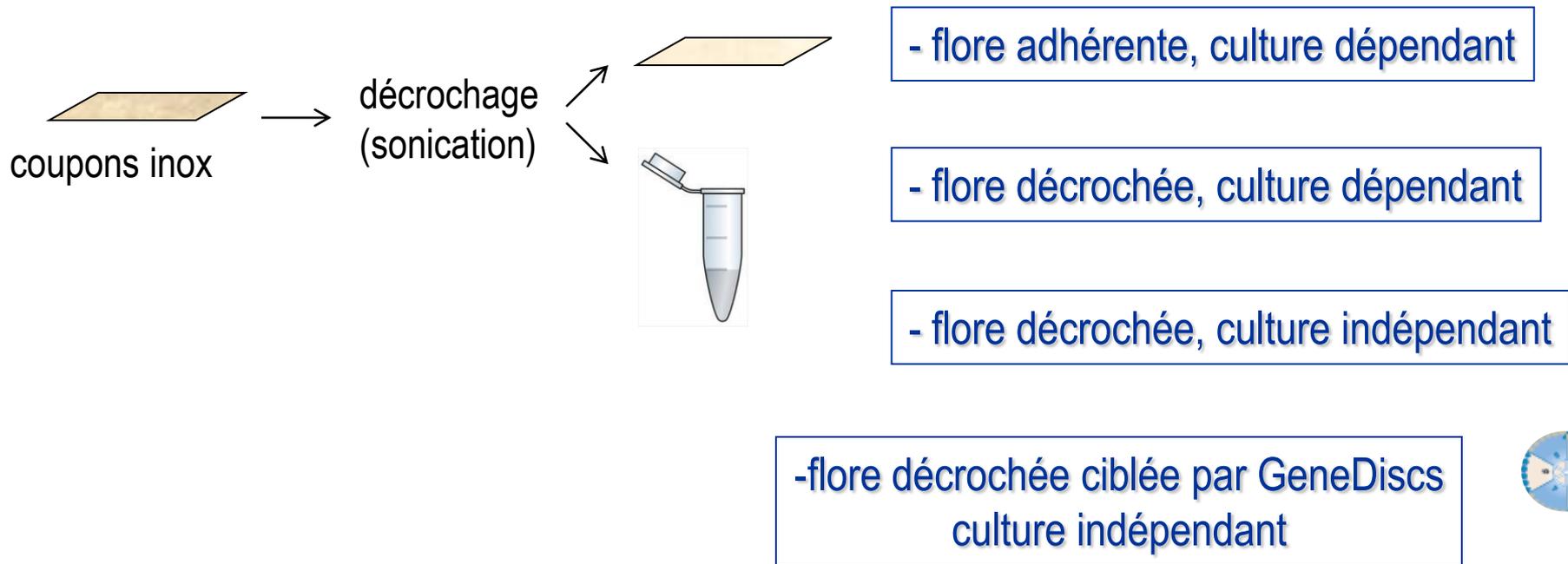
Diamètre tuyauterie (\varnothing ext./ \varnothing int.): 38mm / 35.5 mm

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

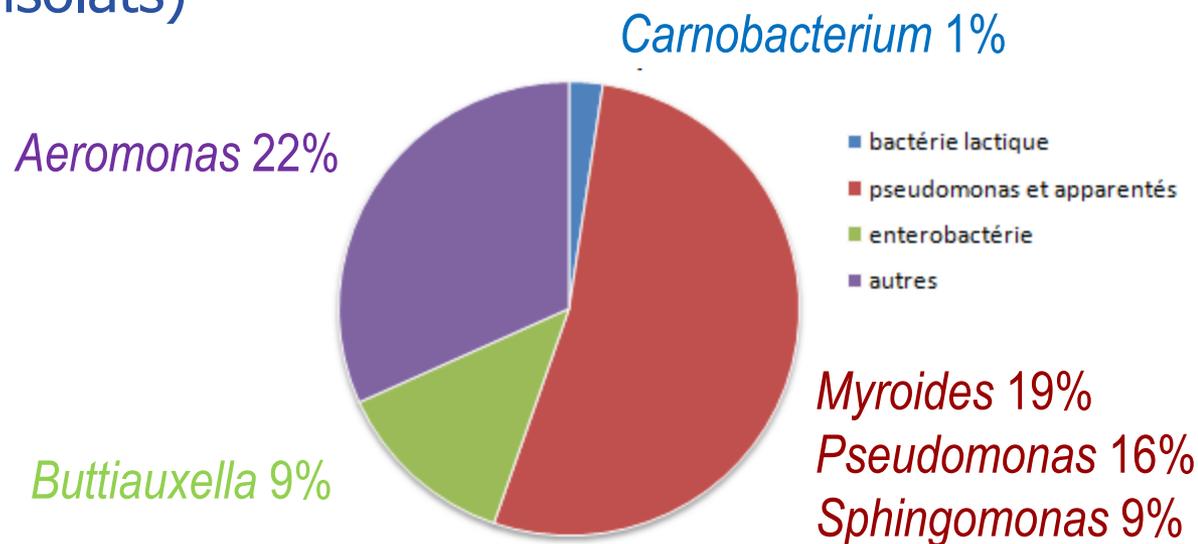
- Analyse de la flore présente dans la matrice ayant des capacités d'adhésion aux surfaces inox
 - Flore décrochée des surfaces inox après 9j: quantification
 - Adhésion équivalente de la flore psychrotrophe et mésophile aérobie facultative... mais peu de spore !!!
 - Flore décrochée des sections est 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/cm² (croissance)
 - 4°C, matrice: 2-4logCFU/cm² (pas croissance)
 - En mode dynamique, en "boucle labo" à 4°C
 - après 2j, 3j et 7j: 2-3logCFU/cm² (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



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 HYGIENIQUE DES LIGNES & ÉQUIPEMENTS
ET AMÉLIORATION DE LA NETTOYABILITÉ

Partenaires

ITAI



Centre interface



Centre technique



Enseignement et recherche

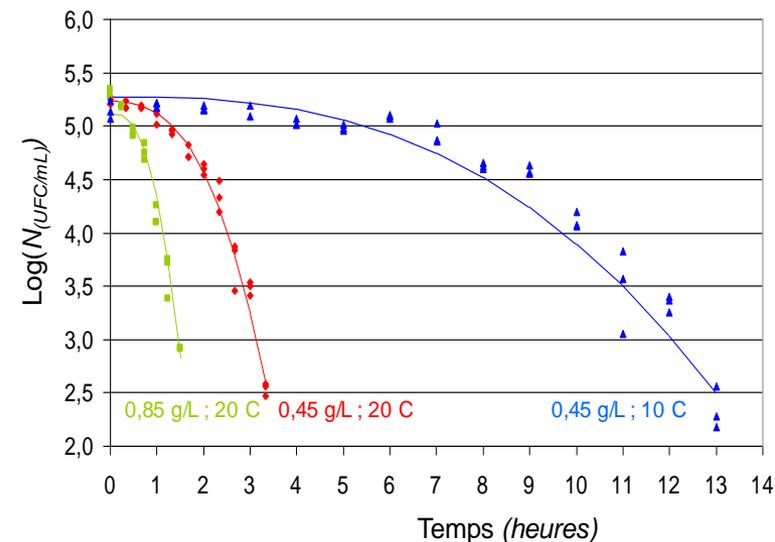


- 3 groupes de travail
 - Action scientifique
 - Biocontaminations et interface matériaux-substrat
 - Conception hygiénique
 - Nettoyage et désinfection
 - Formation initiale et continue
 - Dissémination et outil "Wik'Hygénie"

- Coordination, C. Hermon, CTCPA
 - ✉ CHERMON@ctcpa.org

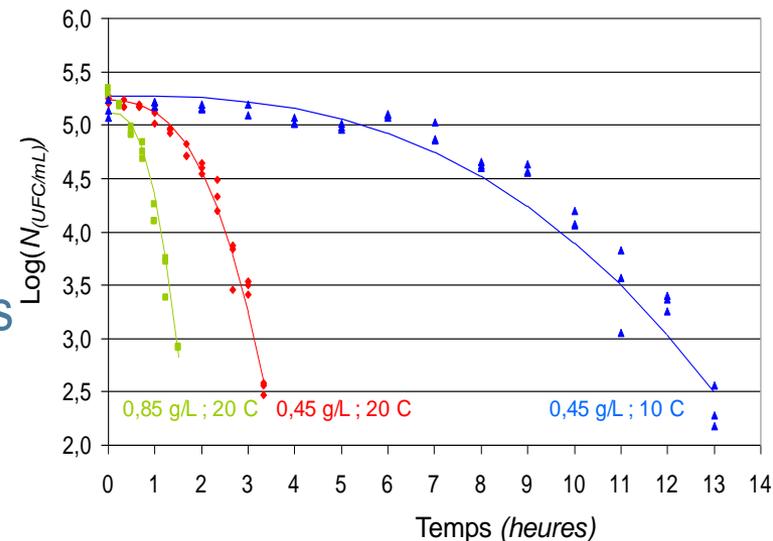
UMT 08.3 PHYSI'Opt

- 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