

The background of the entire page is a dense, colorful pattern of various microorganisms, including bacteria, fungi, and viruses, rendered in a stylized, hand-drawn manner. The colors used include blue, purple, green, red, orange, and grey. The organisms are scattered across the page, with some appearing larger and more detailed than others. A prominent feature is a large, black, spiral-shaped structure on the right side, resembling a bacterium or a piece of fabric. The overall effect is a complex, textured field of biological forms.

HYGIÈNE

Réalisation d'essais
de l'adhésion microbienne
à la formation de biofilms

Le RMT Actia Chlean

Ce guide a été réalisé par les partenaires du Réseau mixte technologique (RMT) Actia Chlean « Conception hygiénique des lignes et des équipements, et amélioration de la nettoyabilité ». Ce réseau labellisé par le ministère chargé de l'Agro-alimentaire sous l'égide de l'ACTIA réunit dix-sept partenaires sur le plan national, tous experts sur la thématique de la conception hygiénique.



Coordonné par le CTCPA, ce RMT regroupe des Instituts techniques agro-industriels (Actalia, Adiv, Adria Développement, CTCPA, Ifip - Institut du porc, IFV - Institut français de la vigne et du vin), un partenaire interface (Critt Provence-Alpes-Côte d'Azur), des partenaires techniques (Adrianor, Casimir) et des établissements d'enseignement et de recherche (AgroParisTech, Anses, Énil de Mamirolle, Inra LGPTA, IUT de Laval, lycée agricole de Laval, Oniris, université Lyon 1 - Biodymia).

Les objectifs principaux du RMT sont de répondre aux besoins de l'industrie agro-alimentaire en termes de recherche & développement, de formation et de mise à disposition d'outils tels que ce guide de bonnes pratiques.

Depuis 2009, le RMT Actia Chlean a abordé trois problématiques.

Mise en place de programmes de R&D centrés sur:

- ▬ la biocontamination des surfaces (encrassement, adhésion microbienne et formation de biofilms);
- ▬ la conception hygiénique des équipements;
- ▬ la mise en œuvre du nettoyage et de la désinfection.

Diffusion des méthodes et outils d'aide à la décision par:

- ▬ la mise en place d'une encyclopédie évolutive avec contributeurs autorisés sur le principe collaboratif wiki;
- ▬ la rédaction de guides experts;
- ▬ l'organisation de transfert d'information au travers de colloques, conférences, séminaires, articles scientifiques et techniques.

Contribution à la formation initiale et continue par le développement et la mise à jour de modules portant sur:

- ▬ la maintenance;
- ▬ le nettoyage et la désinfection en agro-alimentaire;
- ▬ la qualité.

Préparation des essais

1. Constitution et gestion d'une souchothèque par congélation	13
2. Constitution d'un stock secondaire ou stock de travail	15
3. Préparation de l'inoculum ou de la suspension d'essai	17
a. Réalisation des précultures	17
b. Préparation des suspensions microbiennes	17
c. Préparation des suspensions de spores	18
4. Préparation des supports solides non poreux	20
a. Protocole de nettoyage.....	20
b. Conditionnement des supports solides	22
5. Préparation des supports solides poreux	22
a. Exemple du bois.....	22
b. Exemple du textile.....	24

Réalisation des essais d'adhésion

1. En conditions statiques	27
a. Contamination par dépôt.....	27
b. Contamination par immersion.....	29
c. Contamination par aérodiffusion.....	30
2. En conditions dynamiques	31
a. Dispositifs expérimentaux commercialisés.....	31
b. Autres dispositifs.....	32

De l'adhésion microbienne à la formation de biofilms

1. Essais de formation de biofilms en conditions statiques	35
2. Essais de formation de biofilms en conditions dynamiques	36

Évaluation de la contamination des surfaces

1. Microscopie	41
2. Mise en culture après décrochage.....	43
a. Technique de décrochage aux ultrasons	43
b. Technique de brossage.....	44
c. Résultats de comparaison des deux méthodes de décrochage	45
3. Mise en culture directe.....	47

Annexes

Annexe 1. Bibliographie	51
Normes	51
Ouvrages généraux.....	52
Annexe 2. Glossaire	55
Annexe 3. Contacts utiles	61

Dans les industries agro-alimentaires, la biocontamination des surfaces peut entraîner des pertes de rentabilité importantes liées notamment à :

- ▬ une augmentation de la consommation d'énergie due à un encrassement des matériaux;
- ▬ une réduction de la productivité liée aux arrêts de production pour éliminer la biosalissure;
- ▬ une dégradation du produit fini;
- ▬ une augmentation des coûts de maintenance et des coûts d'exploitation.

Lorsqu'elle implique des germes pathogènes, cette biocontamination peut être à l'origine de problèmes de santé publique parfois sévères. Selon les données de l'Institut de veille sanitaire, un tiers des agents pathogènes responsables d'infections (estimées entre 735 000 et 770 000 par an) est apporté par la voie alimentaire ^[12]²¹. Cette biocontamination se fait notamment par les surfaces en contact.

En effet, toute surface en contact avec des micro-organismes pourra, plus ou moins rapidement, être contaminée par ces germes. Les conditions qui règnent sur les surfaces des ateliers et des équipements des industries agro-alimentaires étant généralement favorables à la croissance cellulaire, ces micro-organismes adhérents pourront se multiplier, et former des édifices tridimensionnels plus ou moins complexes et cohésifs, généralement dénommés « biofilms » ^[12]²⁰. Il a été montré que l'état physiologique des micro-organismes au sein d'un biofilm pouvait s'apparenter à certains états de stress ou de latence augmentant ainsi leur résistance aux facteurs défavorables de l'environnement ^[12]¹⁹, par exemple les procédures de nettoyage et de désinfection.

Même présents en faible nombre, les germes résiduels ¹ peuvent, après transfert à un aliment où règnent des conditions favorables à la croissance, se multiplier et conduire, dans le cas de bactéries pathogènes, à des doses infectantes ^[12]¹⁸. On sait aujourd'hui que toutes les surfaces sont susceptibles d'être contaminées: aciers inoxydables, polymères, céramiques, verre... Certaines zones sont cependant plus propices à la biocontamination en raison de leurs caractéristiques chimiques, physico-chimiques (caractère hydrophobe ou hydrophile, propriétés électriques en particulier) et de leur topographie. Les lieux où de fortes contaminations de surface ont été constatées et qui peuvent donc être des sources permanentes de contamination, sont généralement des zones de rétention peu accessibles au nettoyage, comme les coudes de tuyauterie, les tapis de convoyeur, les canalisations d'écoulement d'eaux usées, les sols, les joints...

¹ Germes persistants après les opérations de nettoyage et de désinfection.

Conscient des enjeux socio-économiques et scientifiques que peuvent générer de tels phénomènes bioadhésifs, le RMT ACTIA CHLEAN s'est fixé plusieurs missions, parmi lesquelles l'amélioration des connaissances des phénomènes bioadhésifs (incluant l'adhésion microbienne et la formation de biofilms) pour proposer, aux industriels et aux filières du secteur agro-alimentaire, des solutions innovantes dans la maîtrise du risque sanitaire des produits et de l'hygiène des matériaux.

Un premier état de l'art associé à un recensement des pratiques interlaboratoires a ainsi été effectué. Ce bilan a permis de montrer que les nombreuses études réalisées jusqu'à présent dans le domaine de « l'adhésion microbienne » et de la « formation des biofilms », reposaient le plus souvent sur des méthodes de biocontamination surfacique, spécifiquement développées par chacune des équipes impliquées. Ces méthodes résultent en général, d'une combinaison de matériels et méthodes bibliographiques, d'habitudes de laboratoires et de contraintes ou de spécificités applicatives. Cette multitude de méthodologies se traduit aujourd'hui par un grand nombre de données, mais celles-ci restent souvent divergentes et certainement sous-exploitées faute de pouvoir être comparées et intégrées dans une base de données mutualisée au niveau national voire international. Cette absence de standardisation méthodologique entraîne également des déficiences dans la rationalisation des essais et des expérimentations envisagées.

Dans ce contexte, il est apparu nécessaire de proposer des méthodes harmonisées pour étudier l'adhésion microbienne, première étape de la formation de biofilms.

Ces méthodes et les recommandations qui y sont associées sont destinées à tout laboratoire qui souhaite mener des travaux nécessitant des surfaces contaminées (cellules adhérentes ou biofilm) pour, par exemple:

- ▬ évaluer l'efficacité d'agents nettoyants et désinfectants;
- ▬ étudier les biotransferts de la surface vers l'aliment;
- ▬ déterminer l'aptitude à l'adhésion de différents micro-organismes;
- ▬ optimiser des techniques de décrochement;
- ▬ comparer des techniques de contrôle de la qualité microbiologique des surfaces;
- ▬ améliorer la nettoyabilité de surfaces...

ATTENTION

Des essais interlaboratoires ont permis de mettre en évidence des points de vigilance rappelés tout au long de ce document dans des encarts appropriés. Les expériences réalisées ont clairement montré que chaque écart à la méthode pouvait entraîner un écart de reproductibilité.

DISTINCTION ENTRE ADHÉSION ET BIOFILM

Les travaux portant sur l'adhésion font appel à des temps de contact micro-organismes/matériaux relativement courts allant de quelques minutes à quelques heures suivant les applications et ne nécessitant pas obligatoirement des milieux nutritifs. Les structures qui en résultent sont en 2D.

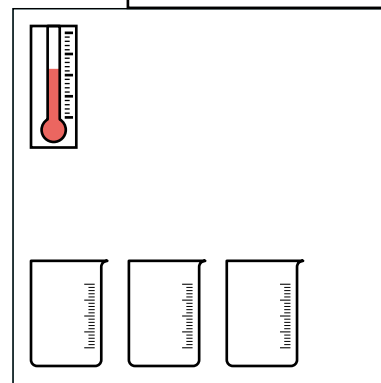
La formation du biofilm débute après la phase d'adhésion. Elle nécessite des milieux permettant la multiplication cellulaire et des temps de croissance variant de quelques heures à plusieurs jours. Les structures observées sont en 3D.

Par exemple, l'étude de la biocontamination d'une conduite de transfert de lait (de la salle de traitement du lait jusqu'à la salle de fabrication où se trouvent les cuves de transformation) doit intégrer le temps total de contact avec le lait.

Si ce temps total est d'une ou deux heures, il s'agit alors d'un phénomène d'adhésion car le temps est beaucoup trop court pour parler de formation de biofilm. La modélisation en laboratoire devra donc correspondre à l'étude des phénomènes d'adhésion.

En revanche, si on envisage d'évaluer la biocontamination d'un circuit ou d'un équipement après une certaine durée de fonctionnement avant de réaliser un nettoyage (par exemple dans le cas d'un transfert de yaourts vers des conditionneuses), le temps de contact est beaucoup plus long, ce qui laisse entendre que la formation d'un biofilm est possible (en fonction du produit transféré et de l'environnement).

Préparation des essais



1. Constitution et gestion d'une souchothèque par congélation

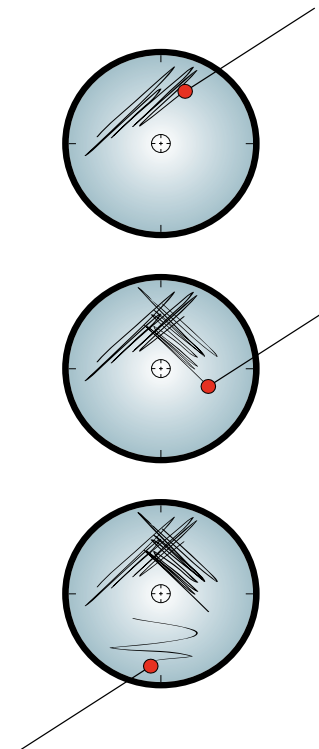
La congélation des suspensions microbiennes à très basse température (froid mécanique de -80 °C à -150 °C , ou vapeur d'azote à -176 °C) en présence d'une solution cryoprotectrice permet la préservation de la viabilité des bactéries. Le glycérol est le cryoprotecteur le plus souvent utilisé.

ATTENTION

Pour des températures de congélation comprises entre -18 °C et -40 °C , la stabilité des souches peut être compromise (perte de viabilité ou modification de phénotypes notamment au niveau des propriétés physico-chimiques...). La durée de conservation des souches doit par conséquent être réduite (entre 6 mois et 1 an).

La conservation des souches se fait à partir d'une culture dont la pureté doit être vérifiée. On peut par exemple utiliser la méthode des quadrants.

La méthode des quadrants est une technique d'isolement par épuisement qui permet de séparer les bactéries d'une suspension et d'en vérifier ainsi la pureté. Elle permet d'obtenir des colonies différentes, espacées les unes des autres. Comme illustré sur le schéma ci-contre, elle consiste à diviser une boîte de Petri en deux (50 % et 50 %), puis à diviser de nouveau par deux l'une des moitiés afin d'obtenir 3 quadrants de 50 %, 25 % et 25 % de la surface totale. Sur le plus grand quadrant, une petite quantité d'inoculum est posée puis étalée à l'aide d'une aëse. On pivote ensuite la boîte afin d'étaler les bactéries sur un quadrant plus petit, puis on tourne à nouveau afin d'ensemencer le dernier petit quadrant. Les stries doivent être serrées. Si l'isolement a été correctement effectué, il est possible d'obtenir des colonies isolées sur le dernier quadrant.



Les préconisations suivantes sont issues des procédures de conservation du *Resomil* [63]¹¹.

À partir d'une suspension microbienne ou d'un prélèvement d'une colonie à l'aide d'une œse, ensemer un volume de bouillon de culture spécifique de l'espèce à cultiver (exemple 0,1 ml ou 1 colonie dans 10 ml)². Incuber à la température optimale de croissance du micro-organisme; adapter le taux d'inoculum initial ou la durée d'incubation de manière à obtenir des cultures en début de phase stationnaire. Après incubation, prélever un volume (en fonction des besoins, par exemple 10 ml pour dix cryotubes) de la culture et ajouter un volume de glycérol à 30 % autoclavé et maintenu à température ambiante (concentration finale en glycérol de 15 %³).

Conservation par lyophilisation

La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit préalablement congelé par évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (l'eau passe directement de l'état solide à l'état gazeux). La vapeur d'eau qui quitte le produit est capturée par congélation à l'aide d'un condenseur ou piège froid.

On distingue trois phases dans un cycle de lyophilisation :

- la congélation, qui permet de transformer l'eau en glace à des températures de -40 °C à -80 °C,
- la dessiccation primaire sous vide qui consiste à sublimer la glace libre,
- la dessiccation secondaire qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau liées.

Ces opérations sont réalisées avec un lyophilisateur. Le lyophilisat obtenu est stocké dans des ampoules scellées. Il peut être conservé plusieurs années.

Homogénéiser par agitation douce manuelle et répartir en cryotubes (1,5 ml de suspension maximum pour un contenant de 2 ml). La durée de l'opération (à température ambiante), correspondant au temps de contact entre les bactéries et le glycérol, doit être de quinze minutes minimum à trente minutes maximum avant la congélation.

Remarque : la dilution en milieu glycérolé est à adapter en fonction de la souche utilisée. Ainsi, pour les bactéries acidifiantes, il est intéressant de reprendre les cultures dans un volume important de milieu frais afin de tamponner le milieu, en particulier en l'absence de centrifugation : 10 % de milieu de culture + 90 % de milieu spécifique additionné de glycérol à 15 %.

² Pour dix cryotubes de 2 ml, prévoir à minima 5 ml de culture.

³ Concentration en glycérol m/m ou m/v

ATTENTION

Éviter la congélation en microbilles qui conduit à des décongélations-congélations successives en cours d'utilisation, sources de contamination ainsi que d'une altération possible des cellules; cette altération peut se traduire par une perte partielle ou totale de la viabilité des cellules mais également par une modification de leurs caractéristiques phénotypiques. Pour ces mêmes raisons, il est préférable de prévoir un prélèvement unique par cryotube.

La centrifugation, qui peut entraîner un stress est déconseillée sauf nécessité (biomasse faible, souche sensible au pH nécessitant un lavage). Si la centrifugation est nécessaire, préférer une centrifugation permettant d'obtenir un culot dense et facile à remettre en suspension (3000 à 7000 g durant 10 à 20 minutes à 4 °C). Reprendre la totalité du culot cellulaire dans la moitié ou 1/10^e du volume initial en milieu additionné de glycérol à 15 % (milieu maintenu à température ambiante).

2. Constitution d'un stock secondaire ou stock de travail

Afin de préserver la souchothèque originelle (limiter le nombre de repiquages, éviter la contamination des souches...), il est conseillé de réaliser un stock de travail [63]¹¹. Ce stock de travail est constitué à partir de la souchothèque (cryotubes de suspension microbienne congelée ou lyophilisats).

Il peut être conservé au froid mécanique à -20 °C, -40 °C ou -80 °C. La durée d'utilisation du stock de travail est de six mois à deux ans selon la température de congélation utilisée.

Dans le cas de souches sensibles conservées à -20 °C, il est recommandé de limiter la durée d'utilisation à six, voire quatre semaines.

D'une façon générale, il est nécessaire de prévoir un stock suffisant pour la totalité de l'étude (si la durée de conservation le permet).

Stock de travail à partir de cryotubes

Procéder à une décongélation rapide du cryotube à 30 °C ou 37 °C au bain-marie jusqu'à disparition du glaçon (homogénéisation manuelle). Inoculer ensuite 1 ml de la suspension microbienne dans 100 ml (1 %) de milieu de culture approprié à la souche utilisée. Incuber à la température optimale de croissance de la bactérie jusqu'au début de la phase stationnaire. Cette manipulation correspond au premier repiquage (R14) et a pour but de rétablir le métabolisme microbien.

Procéder ensuite comme au premier paragraphe « Constitution et gestion d'une souchothèque par congélation » : prélever un volume (en fonction des besoins, par exemple 10 ml pour 10 cryotubes) de la culture et ajouter un volume de glycérol à 30 % (concentration finale en glycérol de 15 %).

Comme mentionné précédemment, la dilution en milieu glycérolé est à adapter en fonction de la souche utilisée.

Distribuer la suspension ainsi préparée à raison de 1,5 ml par cryotubes par exemple et les conserver de préférence à - 80 °C (surtout si la durée de l'étude est importante) mais dans tous les cas à - 20 °C minimum. Ce stock de travail (cryotube dédié à un prélèvement unique) assure pour chaque manipulation des suspensions équivalentes. Comme pour la souchothèque originelle (stock primaire), l'utilisation de cryobilles est à proscrire.

Stock de travail à partir d'ampoules de lyophilisat

La réhydratation du lyophilisat est réalisée par ajout de milieu de culture dans l'ampoule. Sauf exigence particulière de la souche étudiée, 0,5 ml de BHI (Brain Heart Infusion) est ajouté au lyophilisat. La suspension est transférée dans un tube de BHI et conservée une heure à 20 °C. Elle est ensuite incubée aux conditions optimales de croissance du germe. À partir de cette suspension, le stock de travail peut être constitué comme indiqué précédemment.

La pureté de chaque suspension de travail, obtenue à partir de cryotubes ou d'ampoules de lyophilisat, devra être vérifiée *via*, par exemple, la méthode des quadrants [👁 page 15].

La viabilité des suspensions microbiennes congelées peut être vérifiée au besoin (par exemple au cours de la conservation du stock de travail), à partir d'un cryotube aliquot après décongélation par inoculation d'1 ml dans 9 ml de tryptone-sel (TS). Après les dilutions successives en TS, le dénombrement est effectué sur un milieu de culture et dans les conditions d'incubation appropriées à la souche.

3. Préparation de l'inoculum ou de la suspension d'essai

A] RÉALISATION DES PRÉCULTURES

Pour les essais d'adhésion et de formation de biofilms, les croissances à partir de cultures en bouillon sont préférables pour une meilleure homogénéité de l'état physiologique de la population microbienne.

Expérimentalement, procéder à une décongélation rapide à 30 °C ou 37 °C au bain-marie jusqu'à disparition du glaçon (homogénéisation manuelle) d'un cryotube du stock de travail. Inoculer ensuite 1 ml de la suspension microbienne dans 9 ml de bouillon de culture approprié à la souche utilisée. Incuber à la température désirée jusqu'à atteindre le début de la phase stationnaire (R1⁴).

Après ce temps d'incubation, inoculer 1 ml du R1 dans 9 ml de bouillon de culture approprié et incuber à la température désirée jusqu'à atteindre le milieu de la phase exponentielle (R2⁵).

La culture de travail (R3⁶) est obtenue par ensemencement de 1 ml du R2 dans 100 ml du bouillon de culture approprié suivi d'une incubation à la température désirée selon la souche étudiée. En alternative, le choix de milieux simulant les conditions industrielles peut être effectué. D'une façon générale la population microbienne doit se situer en phase stationnaire.

La pureté de chaque suspension de travail sera vérifiée *a minima*, par la méthode des quadrants sur les cultures R2 et R3.

B] PRÉPARATION DES SUSPENSIONS MICROBIENNES

À l'issue des précultures, la culture microbienne R3 est lavée par trois centrifugations successives (par exemple : 7 000 g, 10 minutes, 4 °C) avec remise en suspension du culot dans la solution d'essai (par exemple une solution d'eau physiologique, une solution de PBS, un fluide issu d'une matrice alimentaire...). Ces étapes de centrifugations permettent d'éliminer les traces de milieu et les métabolites cellulaires produits au cours de la croissance.

⁴ R1 : premier repiquage

⁵ R2 : deuxième repiquage

⁶ R3 : troisième repiquage

ATTENTION

La remise en suspension des cellules microbiennes doit être rapide afin d'éviter le séchage, notamment lors de la présence de sel dont la cristallisation peut avoir un effet létal sur ces cellules.

Rappel: bien que nécessaire, la centrifugation peut générer des stress. Si elle est cependant indispensable, préférer une centrifugation permettant d'obtenir un culot dense et facile à remettre en suspension [👁 page 17].

C] PRÉPARATION DES SUSPENSIONS DE SPORES

Ce paragraphe a été rédigé conjointement avec le groupe de travail du RMT ACTIA QUALIMA « Maîtrise de la qualité microbiologique des aliments », intitulé « Enrichissement du protocole de mise en œuvre du challenge-test produit / procédé pour les bactéries sporulées ».

Préparation des spores

Que ce soit pour *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* et genres apparentés, le protocole de préparation des spores diffère selon la bactérie sporulée testée et dépend également du savoir-faire développé au sein de chaque laboratoire. Les informations fournies sont donc d'ordre général.

Une phase d'enrichissement est pratiquée en inoculant la suspension microbienne provenant du stock de travail dans un bouillon nutritif adapté à l'espèce étudiée [👁 page 17]. Notons qu'il n'est pas nécessaire de procéder à plusieurs précultures.

Après un temps d'incubation à la température désirée (et en anaérobiose si besoin), ensemer le bouillon ou la gélose de sporulation approprié avec la suspension microbienne et incuber à la température désirée jusqu'à atteindre un taux de sporulation suffisant.

Si possible, il doit être observé 80 à 90 % de spores. La durée de cette étape varie de 2 à 21 jours selon l'espèce ou la souche concernée : le temps et les conditions de croissance sont intimement liés à la souche utilisée. Généralement, le taux de sporulation est contrôlé et validé par observation microscopique (état frais).

Les spores sont récoltées par raclage de la surface de la gélose de sporulation avec de l'eau distillée stérile (10 ml) puis lavage, ou, lors d'utilisation de bouillon, directement par lavage. Pour cela trois phases successives de lavages par centrifugations (vitesses variables) dans de l'eau distillée stérile ou ultra-pure stérile à 4 °C sont effectuées.

Afin d'éliminer les formes végétatives, un traitement thermique est réalisé ; celui-ci est variable en fonction de la thermorésistance des souches, soit 10 minutes entre 75 °C et 80 °C pour les bactéries faiblement thermorésistantes, soit 10 minutes à 100 °C pour les souches plus thermorésistantes.

ATTENTION

Le traitement thermique peut modifier la composition et les propriétés de surface des spores au niveau notamment des propriétés d'hydrophobie et d'hydrophilie.

La concentration de spores est vérifiée par dénombrement sur milieu gélosé et dans les conditions d'incubation appropriées à la souche étudiée.

Conservation des spores

Les spores sont conservées généralement à +4 °C dans de l'eau distillée stérile pendant un an. Pendant cette période, il est nécessaire de vérifier que la suspension n'évolue pas en contrôlant sa concentration par exemple.

Il existe plusieurs normes françaises concernant le dénombrement des spores en microbiologie alimentaire : à titre d'exemple la norme NF V 08-250 de février 2010 est un récapitulatif des traitements thermiques préconisés et la norme NF V 08-602 de mai 2011, traite de l'analyse de quatre flores sporulées dans les matières premières des conserves.

Préparation des suspensions de spores pour essai

Une partie aliquote de la suspension de spores peut être utilisée telle quelle pour les essais ou être diluée dans la solution d'essai (solution d'eau physiologique, solution de PBS, fluide issu d'une matrice alimentaire).

ATTENTION

Il est conseillé de prévoir une quantité suffisante de spores afin d'effectuer l'ensemble des essais prévus à partir d'un même lot et ce, pour limiter la variabilité due à la sporulation.

Il peut être intéressant de tenir compte de cette variabilité lors de la réalisation d'une étude. À cette fin, les manipulations pourront être répétées sur différents lots de sporulation.

4. Préparation des supports solides non poreux

Préalablement aux essais de biocontamination, les supports sont découpés en échantillons de taille connue.

A] PROTOCOLE DE NETTOYAGE

Pour préserver les propriétés initiales des matériaux, une procédure de nettoyage standardisée devra être utilisée. L'agent employé ne devra laisser aucun résidu sur la surface après rinçage. À titre d'exemple, la procédure suivante pourra être appliquée :

- ▢ immersion dans une solution détergente et désinfectante diluée dans de l'eau à 50 °C ultra-pure ou distillée sous agitation douce pendant dix minutes ;
- ▢ cinq rinçages de cinq minutes chacun par trempage de l'échantillon dans de l'eau ultra-pure ou distillée à 50 °C ;
- ▢ cinq rinçages de cinq minutes chacun par trempage de l'échantillon dans de l'eau ultra-pure ou distillée à température ambiante.

Pour les supports en acier inoxydable, il faut prévoir une étape préliminaire de dégraissage avec un mélange acétone / éthanol à 50 % v / v. Cette opération doit être réalisée par frottage au moyen d'une lingette non abrasive et non pelucheuse.

Remarque : les supports devront être utilisés immédiatement après nettoyage (sans étape d'autoclavage), voire stockés dans un récipient stérile contenant de l'eau ultra-pure stérile jusqu'à utilisation finale (ne pas dépasser vingt-quatre heures).

ATTENTION

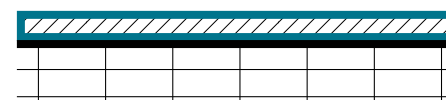
Pour l'acier, l'étape de stockage et notamment en eau ultra-pure stérile peut entraîner une évolution de la surface et modifier son aptitude à la biocontamination. Dans ce contexte, il est préférable d'utiliser les matériaux immédiatement après nettoyage et rinçage.

ATTENTION

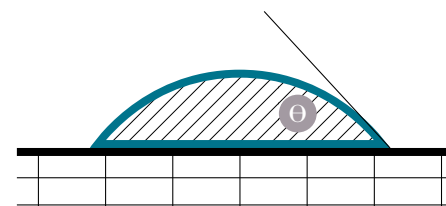
Une fois nettoyés, les supports devront être manipulés avec précaution pour éviter tout risque de recontamination (et de modification des propriétés de surface des échantillons à analyser) :

- manipuler les échantillons à l'aide de pinces propres et proscrire les manipulations avec les doigts ;
- proscrire toute inscription sur l'une ou l'autre des faces à analyser à l'aide de feutres, stylos ou marqueurs (préférer la gravure sur la face opposée à celle étudiée) ;
- proscrire colles, scotchs... pour la fixation des supports (préférer la fixation par « pinces » ou tout autre système mécanique ne libérant pas de substances chimiques).

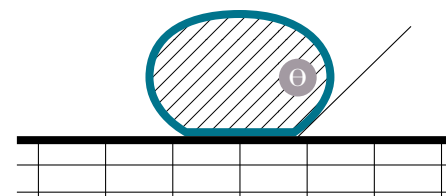
SCHÉMA 1] COMPORTEMENT D'UNE GOUTTE D'EAU SUR DES SURFACES PRÉSENTANT DIFFÉRENTS DEGRÉS D'HYDROPHILIE



Sur une surface hydrophile, cette goutte s'étale complètement (c'est le cas avec du verre propre)



Pour des surfaces à hydrophilie intermédiaire, on peut observer un étalement partiel.



À l'inverse, sur une surface hydrophobe, cette goutte forme une calotte sphérique. (C'est le cas par exemple pour le polytétrafluoroéthylène couramment appelé Téflon.)

Cette affinité eau/surface peut être quantifiée à l'aide d'un goniomètre et par des mesures d'angles de contact (θ).

Le nettoyage des supports doit permettre de retrouver les propriétés initiales du matériau et notamment son caractère hydrophobe ou hydrophile. Cette caractéristique peut être vérifiée rapidement et de façon qualitative par dépôt d'une goutte d'eau sur la surface à analyser comme illustré sur le schéma 1.

Remarque: le protocole de nettoyage peut être différent de celui présenté précédemment si l'on veut par exemple évaluer l'impact de procédures de nettoyage utilisées en industrie sur la biocontamination. Dans ce cas, le protocole mis en œuvre se calera sur celui mis en place dans l'industrie concernée. Il faudra alors se référer à la fiche technique du fournisseur du produit de nettoyage. Dans tous les cas et chaque fois que cela est possible, privilégier l'utilisation d'eau ultra-pure ou distillée à l'eau de ville.

B] CONDITIONNEMENT DES SUPPORTS SOLIDES

Afin de simuler certaines situations industrielles (encrassement, adsorption de minéraux, de molécules ou macromolécules spécifiques...), une étape de conditionnement surfacique ou des cycles de conditionnement-nettoyage pourront être réalisés après le nettoyage des échantillons et avant les essais d'adhésion. Dans ce cas, les échantillons pourront par exemple, être immergés pendant un temps donné et à une température choisie dans une / des solution(s) conditionnante(s). Après traitement, les supports seront retirés du liquide conditionnant, égouttés sur la tranche puis utilisés (avec ou sans rinçage préalable) pour les essais d'adhésion microbienne.

5. Préparation des supports solides poreux

A] EXEMPLE DU BOIS

Préalablement aux essais d'adhésion, les supports doivent être découpés en échantillons de taille définie et nettoyés / désinfectés selon une procédure standardisée. Celle-ci dépendra essentiellement de l'application souhaitée et des objectifs de l'étude.

À titre d'exemple, les procédures suivantes ont été utilisées et validées pour des planches d'affinage en bois d'épicéa.

Essais d'adhésion devant être réalisés à partir de supports en bois « stériles »

Les échantillons de bois, après découpage seront nettoyés par brossage à l'eau froide avec détergent avant d'être trempés dans l'eau chaude (65 °C, quarante minutes) puis séchés (une heure) et autoclavés à 110 °C pendant quinze minutes.

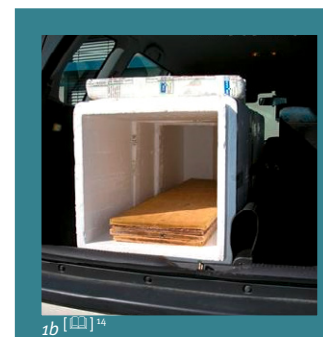
ATTENTION

L'autoclavage risque de déformer certains types de bois et modifier leurs propriétés.

Essais d'adhésion devant être réalisés sur des supports déjà contaminés (par exemple pour étudier l'effet barrière d'autres flores)

Les planches seront récupérées après leur cycle de nettoyage sur le site d'affinage. Elles seront ensuite transportées des caves d'affinage jusqu'aux laboratoires d'analyse. En fonction des possibilités techniques, les conditions de transport peuvent varier sauf pour la maîtrise du taux d'humidité des planches qui doit se maintenir durant l'opération.

Dans l'exemple ci-dessous, la planche à analyser est placée entre deux planches issues de la même cave pour conserver la même humidité et éviter des variations de cette humidité qui pourraient modifier la composition microbienne du biofilm. Un film alimentaire peut être utilisé si nécessaire, pour garantir une meilleure étanchéité et favoriser la stabilité du taux d'humidité.



Le transport des planches peut varier de, une à vingt-quatre heures, selon la distance où se situe le laboratoire d'analyse. La maîtrise des conditions de transport peut s'obtenir par exemple à l'aide d'un caisson en polystyrène expansé pour limiter les variations de température et d'humidité (photo 1b). Un sciage préalable des planches peut s'opérer pour diminuer la taille des planches collectées. Dans tous les cas, les conditions de transport doivent être détaillées pour chaque étude.

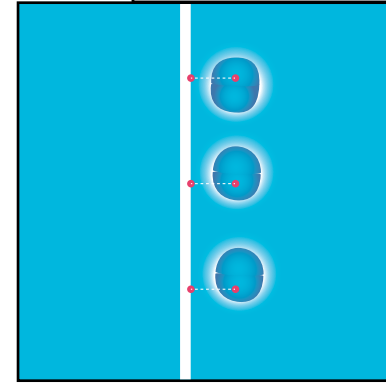
B] EXEMPLE DU TEXTILE

Préalablement aux essais d'adhésion, quatre éprouvettes de textiles (par exemple: 65 % coton / 35 % polyester (C/P) avec un grammage de 250 g/m²) de 0,1 g chacune doivent être découpées par échantillon. Par la suite, la suspension d'inoculum préparée pour être testée est répartie sur ces quatre éprouvettes selon la norme ISO 20743: 2013 ^[10].



Réalisation des essais

d'adhésion



Afin de prendre en compte différentes situations industrielles, les essais d'adhésion microbienne pourront être réalisés en conditions statiques ou dynamiques selon différents modes de contamination.

1. En conditions statiques

A] CONTAMINATION PAR DÉPÔT

Après la préparation des suspensions microbiennes [☞ B] Préparation des suspensions microbiennes, page 17], les germes sont mis en suspension dans le milieu d'étude (par exemple une matrice industrielle ou du TSB dilué au vingtième (1/20^e) pour un apport nutritionnel modéré). Les suspensions sont ensuite diluées successivement dans le milieu d'étude pour obtenir le taux d'inoculation souhaité sur le matériau (taux exprimés en UFC / cm²).



2] Dispositif pour la mesure de la croissance des micro-organismes sur textiles en conditions différentes d'humidités relatives de l'air. (Université Lyon 1 - Biodymia)

Les taux d'humidité relative (HR) de l'air par rapport à la saturation en vapeur d'eau dans l'industrie agro-alimentaire sont situés entre 40 % et 100 %.

Afin de mimer ces différentes conditions d'humidité relative, une étuve à humidité contrôlée peut être utilisée.

En l'absence d'enceintes à humidité contrôlée, des solutions salines peuvent être utilisées (tableau 1).

Expérimentalement, les échantillons à étudier sont déposés dans un couvercle de boîte de Petri de 45 mm de diamètre (à adapter selon la taille de l'échantillon). Cet ensemble (couvercle de boîte de Petri et échantillon) est déposé sur une grille à l'intérieur d'un bocal préalablement stérilisé et contenant la solution saline adéquate (tableau 1) permettant d'obtenir la valeur d'humidité relative choisie.

TABLEAU 1
QUANTITÉ DES SELS CONSIDÉRÉS À AJOUTER À 100 G D'EAU
POUR OBTENIR UNE SOLUTION SATURÉE EN SEL À 30 °C (Chadeau, 2011)

HUMIDITÉ RELATIVE DANS LE BOCAL	SEL UTILISÉ	QUANTITÉ DE SEL À PESER POUR 100 ML D'EAU DISTILLÉE
100 %	-	100 ml d'eau
97 %	K ₂ SO ₄	15 g
90 %	BaCl ₂	60 g
84 %	KCl	40 g
75 %	NaCl	36 g
32 %	MgCl ₂	58 g

À partir des suspensions microbiennes diluées, quelques microlitres à quelques millilitres sont déposés sur la surface à contaminer. L'ensemble est placé à température et temps déterminés en fonction des conditions que l'on souhaite étudier.

À titre d'exemple, le protocole suivant a été utilisé pour contaminer des échantillons de planches de bois d'affinage de fromage. Dans ce cas, 2 ml des suspensions d'inoculation ont été déposées sur une surface de 64 cm² située sur une empreinte et délimitée par un joint en caoutchouc.

Le volume de 2 ml a ensuite été soigneusement réparti sur toute la surface inoculée avec des mouvements circulaires. Un poids (200 g) a ensuite été appliqué sur le joint de caoutchouc par l'intermédiaire d'un support rond (boîte de Petri de diamètre 90 mm), afin d'assurer l'étanchéité pendant la phase de biocontamination.

Après trente minutes de contact, le poids a été retiré et les échantillons de planche incubés à 15 °C et à 99 % HR [14].



3] (Université Lyon 1 - Biodymia)

B] CONTAMINATION PAR IMMERSION

Dans ce type de tests, l'adhésion est réalisée par sédimentation d'une suspension microbienne (ajustée à une concentration microbienne choisie par exemple 10⁶ UFC / ml) pendant un temps donné et à une température définie (par exemple 20 °C) sur les supports solides préalablement nettoyés et éventuellement conditionnés. Les échantillons sont placés préférentiellement horizontalement au fond d'un récipient stérile afin de maîtriser les phénomènes de transport des cellules microbiennes au sein du liquide de suspension. Les temps de contact sont dépendants de l'application choisie (exemple temps de contact du lait dans une cuve). Il est à noter que le phénomène d'adhésion est rapide et qu'un plateau est souvent atteint entre deux et trois heures.

Après ce temps de contact, les bactéries non adhérentes ou faiblement adhérentes sont éliminées par cinq rinçages successifs, par trempage de l'échantillon dans un diluant approprié (par exemple de l'eau physiologique diluée au 1/100^e, liquide de Ringer...).

ATTENTION

Le mode de fixation des surfaces dans le contenant est important, il ne doit pas modifier l'état de surface du matériau testé. Ainsi l'utilisation d'adhésif double face est à proscrire en raison du dégagement de composés volatils susceptibles de s'adsorber sur les surfaces et d'en modifier la composition d'extrême surface. Les échantillons devront, dans la mesure du possible, être posés et maintenus mécaniquement.

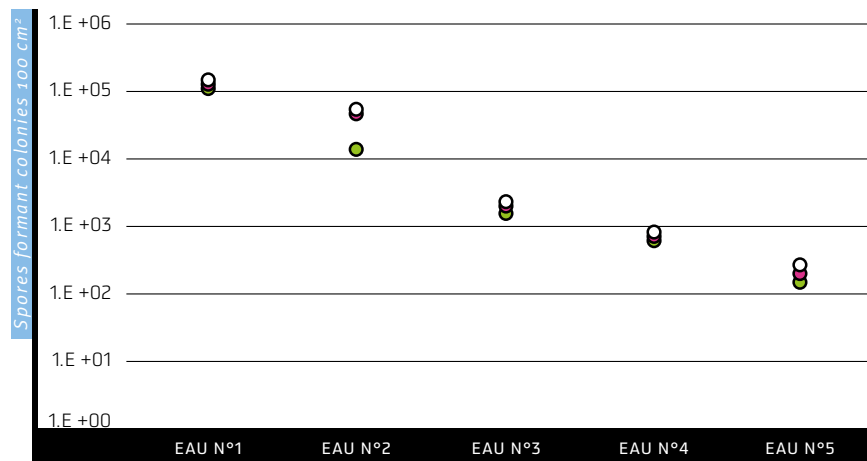
Outre la taille de l'inoculum à standardiser, utiliser de préférence un même volume de fluide au-dessus de l'échantillon à contaminer, pour faciliter l'interprétation des résultats.

C] CONTAMINATION PAR AÉRO-DIFFUSION

La suspension microbienne est déposée sur une surface définie à une concentration appropriée par aéro-diffusion (à l'aide par exemple d'un pulvérisateur) en deux applications sous une hotte microbiologique. Un premier passage par des mouvements horizontaux permet de déposer la moitié de la suspension (distance de vingt centimètres environ entre l'échantillon et le pulvérisateur). Après séchage naturel sous hotte, un deuxième passage avec des mouvements verticaux permet de déposer l'autre moitié de la suspension microbienne. Les échantillons sont ensuite séchés toujours en conditions stériles puis sont stockés pendant une durée de vingt-quatre heures maximum avant de réaliser les essais de nettoyage et / ou de désinfection.

Avant toute utilisation et afin d'éliminer les cellules faiblement adhérentes, un rinçage des échantillons par écoulement d'eau ou par trempage peut être effectué. Il peut être également nécessaire d'avoir recours à plusieurs rinçages successifs comme illustré sur le schéma ci-dessous.

SCHÉMA 2] CONCENTRATION EN SPORES DANS CINQ EAUX DE RINÇAGE



Suivi de la concentration en spores dans cinq eaux de rinçage pour déterminer le nombre de lavages successifs permettant d'éliminer les spores peu adhérentes [10]

2. En conditions dynamiques

Afin de simuler certaines conditions industrielles (écoulement de fluides en circuit fermé), il peut être nécessaire de réaliser des essais d'adhésion en maîtrisant les conditions de circulation du flux.

A] DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX COMMERCIALISÉS

Différents dispositifs sont aujourd'hui disponibles sur le marché pour réaliser ces types d'essais en flux. Pour certains d'entre eux, aucune procédure de préparation des échantillons solides n'est possible. Il est toutefois difficile de donner ici les avantages et inconvénients de chacun de ces dispositifs, ceux-ci étant largement dépendants du type d'essai souhaité. Le lecteur devra se faire son propre référentiel.

ATTENTION

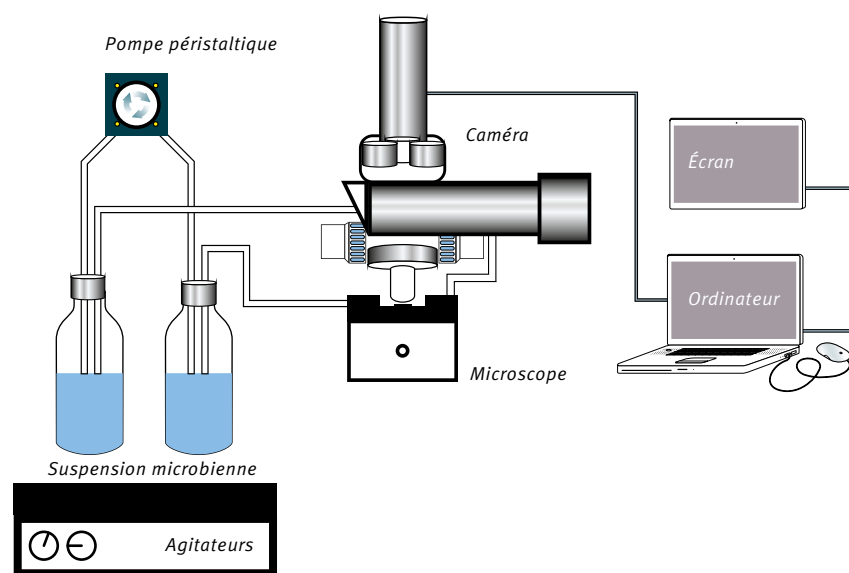
Certains points doivent être étudiés attentivement lors de l'achat d'un dispositif ou lors de sa conception, en fonction des applications souhaitées :

- positionnement de l'échantillon;
- possibilité de régler ou non la vitesse du flux;
- régulation de la température;
- type et nature des échantillons pouvant être utilisés;
- aptitude au nettoyage et à la désinfection du dispositif;
- méthode d'analyse de la biocontamination (microscopie, dénombrement, coloration)...

B] AUTRES DISPOSITIFS

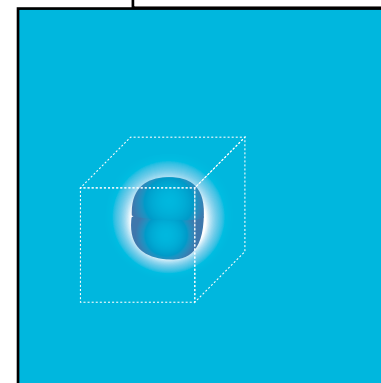
Pour répondre à des besoins spécifiques (contrôle des paramètres de l'écoulement, des procédés de stérilisation, de l'état de surface du matériau à tester), nombre de laboratoires de recherche institutionnels ou privés ont développé leurs propres systèmes. Un de ces systèmes est présenté ci-dessous.

SCHEMA 3] EXEMPLE DE DISPOSITIF EXPERIMENTAL DEVELOPPE POUR LA REALISATION D'ESSAIS D'ADHESION EN CONDITIONS DYNAMIQUES (UMR APT-INRA MICALIS, EQUIPE B2HM)



De l'adhésion microbienne

à la formation de biofilms



Le développement du biofilm débute après l'étape d'adhésion et son temps de formation peut varier entre quelques heures et plusieurs jours. Les critères expérimentaux conduisant à la formation du biofilm devront être adaptés en fonction des objectifs fixés et des situations que l'on cherche à simuler. Il est ainsi possible après l'étape d'adhésion :

- ▬ de renouveler le milieu environnant (toutes les vingt-quatre heures par exemple) ou, à l'inverse, de garder le milieu initial durant toute la durée de l'expérimentation ;
- ▬ d'utiliser un milieu nutritif « riche » ou à l'inverse très pauvre en nutriments...

Les protocoles d'étude mis en place ainsi que les équipements « pilotes » ou « paillasse » doivent intégrer au mieux les applications industrielles afin d'approcher les phénomènes réels.

Le champ d'étude étant très large (matériaux, géométries, cinétiques, produits alimentaires...), on rencontre une grande diversité de modélisations « paillasse » des pratiques industrielles, abondées de protocoles d'étude pour la plupart internes à chaque laboratoire.

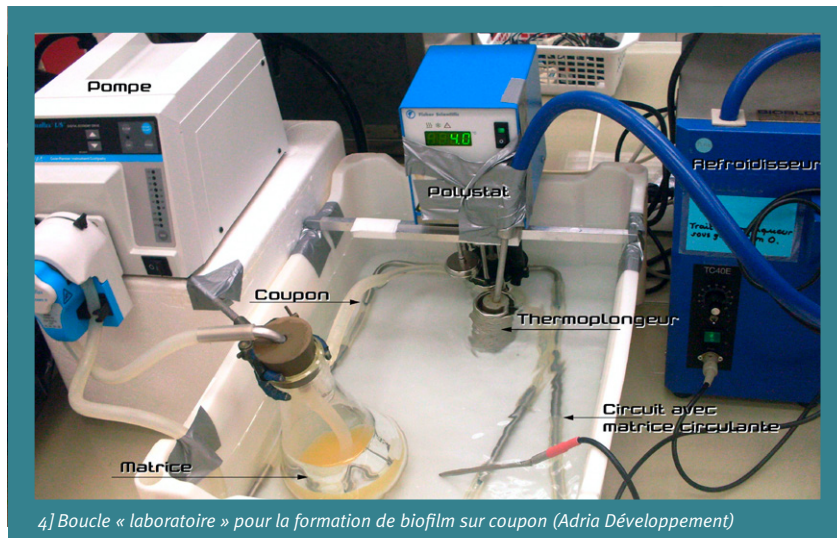
1. Essais de formation de biofilms en conditions statiques

La formation du biofilm commence après l'adhésion, que cette étape soit suivie ou non d'un rinçage du matériau contaminé. En fonction du contexte et de l'application ciblée, il est possible de former ces biofilms sans ajout de nutriments ou en utilisant des milieux plus ou moins complexes : bouillons de culture, eau physiologique, milieux chimiquement définis reproduisant au mieux les conditions de contamination des surfaces en industrie ou encore jus ou exsudats (lactosérum, jus de viande, jus de poisson...) [15].

Les temps de contact peuvent également varier en fonction du contexte de l'étude. Ce temps peut par exemple correspondre au délai entre deux procédures de nettoyage-désinfection appliquées sur le site industriel ou simuler une accumulation microbienne sous forme de niches en entreprise (de quelques heures à plusieurs jours).

2. Essais de formation de biofilms en conditions dynamiques

Afin de simuler certaines conditions industrielles (écoulement de fluides en circuit fermé), il peut être nécessaire de réaliser des essais d'adhésion et de formation de biofilm en maîtrisant les conditions de circulation du flux. Différents dispositifs expérimentaux sont utilisables.



Dans ce système, le circuit est constitué de tuyaux en acier inoxydable et de tuyaux en plastique. C'est dans les parties en plastique que sont insérés les coupons par exemple en inox, avec lesquels sont effectuées les analyses de quantification des micro-organismes. Ces coupons ont une taille de cinq centimètres sur un centimètre avec un millimètre d'épaisseur et sont disposés à différents endroits du circuit.

Le circuit est plongé dans un bain-marie d'eau déminéralisée dont la température est régulée et maintenue grâce à un refroidisseur avec un thermoplongeur et un polystat.

Le fluide contaminant (ici la matrice alimentaire), placé dans une fiole à vide, de forme *Erlenmeyer* d'un litre, circule en boucle dans le circuit, avec un volume de 500 ml. Il est mis en mouvement grâce à une pompe réglée à 150 ml / min pour s'assurer du régime laminaire.

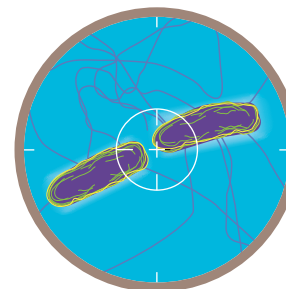
Les cinétiques de formation du biofilm en conditions dynamiques sont déterminées entre quelques heures et sept jours.

ATTENTION

Certains points doivent être étudiés attentivement lors de la définition du protocole expérimental:

- le positionnement du coupon;
- les forces de cisaillement;
- les caractéristiques du flux (laminaire ou turbulent);
- ...

Évaluation de la contamination des surfaces



1. Microscopie

Afin de pouvoir évaluer rapidement la biocontamination d'un support et étudier la répartition des cellules à sa surface, des techniques microscopiques peuvent être utilisées.

L'observation de la totalité des cellules adhérentes sur support transparent peut être réalisée par microscopie à transmission alors que sur support translucide ou opaque, une coloration préalable des cellules via un fluorochrome est nécessaire (acridine orange, syto 9...). Les bactéries adhérentes peuvent par exemple être colorées par une solution d'orange acridine à 0,01 % m/v pendant quinze minutes. Après deux rinçages avec de l'eau ultra-pure stérile, les échantillons seront couverts par une lamelle de verre et observés au microscope à épifluorescence, objectifs x10 et x40.

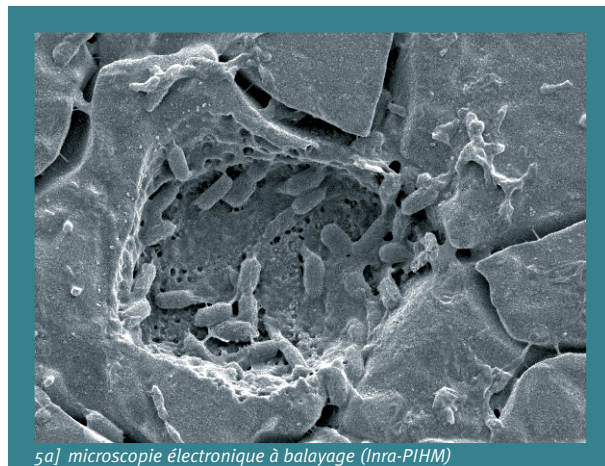
Pour les cellules viables, il existe des marqueurs spécifiques qui peuvent être utilisés en microscopie à épifluorescence, comme le kit *Live/Dead® BacLight™* (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ce kit est composé de deux colorants ayant pour cible les acides nucléiques: le Syto 9 et l'iodure de propidium. Si la membrane plasmique est endommagée, les deux colorants pénètrent dans la cellule et se fixent au niveau des acides nucléiques pour donner une coloration rouge. À l'inverse, si la membrane est intacte, seul le Syto 9 pénètre dans la cellule et la colore en vert. Il est ainsi possible de différencier les cellules viables colorées en vert et les cellules non viables colorées en rouge.

Il existe aujourd'hui différents types de fluorochromes pour le marquage des cellules microbiennes (Grand-Deschamps, 2010).

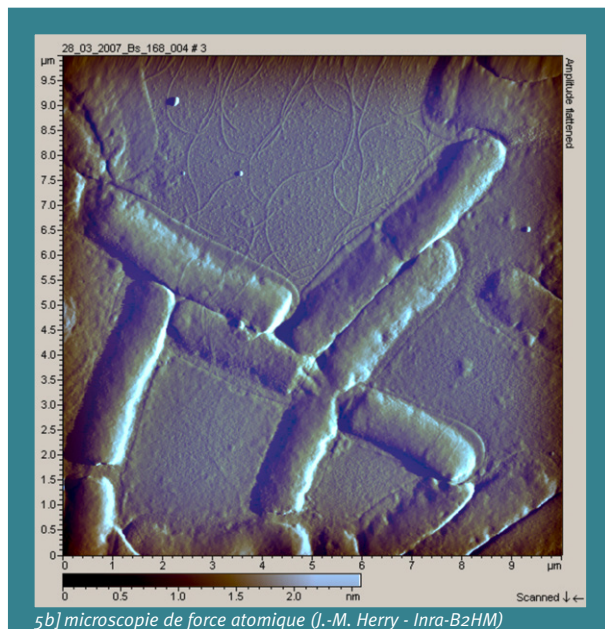
On peut utiliser:

- le Syto 61 qui se fixe sur les acides nucléiques de toutes les cellules. Il est excité à 633 nm et émet entre 640 et 720 nm;
- le Syto 9 qui a le même mode d'action que le Syto 61 mais qui est excité à 504 nm et émet à 523 nm;
- le Sytox Red qui pénètre dans les cellules endommagées et marque les acides nucléiques. Il est excité à 633 nm et émet entre 640 et 750 nm;
- le Sytox Green qui a le même mode d'action que le Sytox Red mais qui est excité à 488 nm et émet entre 510 et 600 nm;
- le iodure de propidium qui pénètre dans les cellules endommagées et se fixe entre les bases des acides nucléiques. Il est excité à 535 nm et émet entre 600 et 700 nm;
- le Chemchrome V6 qui marque les cellules présentant une intégrité membranaire et possédant une activité estérasiq. Il est excité à 488 nm et émet entre 500 et 700 nm.

Des observations par microscopie électronique à balayage (Photo 5a) ou par microscopie de force atomique (Photo 5b) peuvent également être réalisées. Ces techniques microscopiques permettent en effet d'effectuer des analyses submicrométriques du couple micro-organisme / support récepteur.



5a] microscopie électronique à balayage (Inra-PIHM)



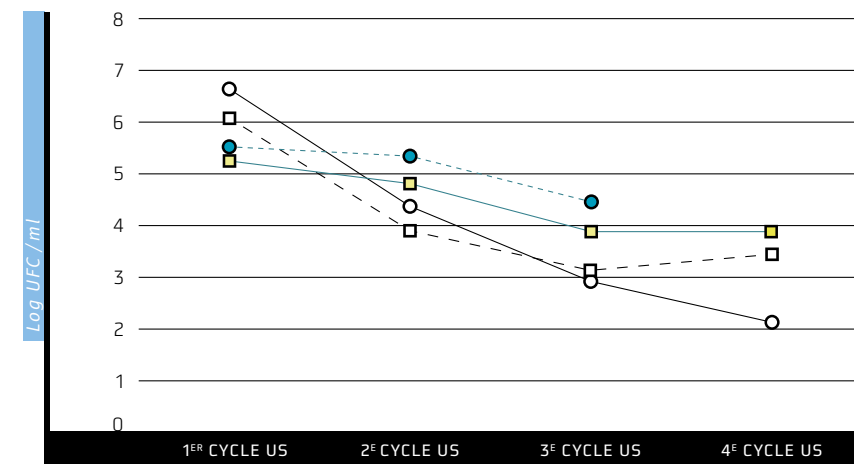
5b] microscopie de force atomique (J.-M. Herry - Inra-BzHM)

2. Mise en culture après décrochage

A] TECHNIQUE DE DÉCROCHAGE AUX ULTRASONS

Les dénombrements de la flore adhérente viable cultivable sont obtenus après immersion des échantillons contaminés dans un diluant (par exemple : 5 ou 10 ml de NaCl 150 mm (eau ϕ) et détachement des cellules adhérentes par exemple grâce aux ultrasons (utiliser de préférence un bain à ultrasons de fréquence comprise entre 35 et 50 kHz) pendant deux minutes à température ambiante suivi d'une agitation mécanique de 40 secondes (vortex). Comme illustré sur le schéma 4 ci-dessous, des cycles d'ultrasons successifs permettent une optimisation du décrochage des cellules adhérentes.

SCHÉMA 4] INCIDENCE DU NOMBRE DE CYCLES D'ULTRASONS SUR LE DÉCROCHAGE DE DIFFÉRENTS GENRES BACTÉRIENS⁷



○ Enterobacter □ Brevibacterium ● Pseudomonas ■ Dietzia

⁷ Adhésion sur coupon inox 304 l (2,8 cm x 2,8 cm) rincé (liquide tryptone sel) immergé dans un flacon stérile contenant 20 ml de tryptone sel. Après chaque cycle d'ultrasons, le coupon est à nouveau rincé puis immergé dans un nouveau flacon. Application de un à quatre cycles successifs de deux minutes à 20 °C (bain à ultrasons Elma ; fréquence 35 kHz ; puissance 320 Watt).

ATTENTION

Quel que soit le bain à ultrasons utilisé, placer les échantillons contaminés dans des récipients en verre. Ne pas utiliser de récipients en plastique.

Le décrochage par ultrasons peut aussi être réalisé avec un générateur d'ultrasons (40 kHz) connecté à une sonotrode portable d'un diamètre de 15 mm et à une chambre de prélèvement en acier inoxydable. Les ultrasons sont délivrés pendant dix secondes dans la chambre de prélèvement, préalablement remplie avec 15 ml de Ringer (solution au 1/4) stérile, directement sur 10 cm² de planche en bois, selon le protocole décrit par Oulahal-Lagsir et al. [16].

ATTENTION

Vérifier que les ultrasons ne provoquent aucun échauffement de la culture microbienne ni diminution de la viabilité. La durée d'application des ultrasons ainsi que le nombre de cycles sont à optimiser selon les matériaux et les germes étudiés.

Après décrochage, les suspensions microbiennes sont ensemencées, selon la méthode des dilutions décimales, sur une gélose adaptée à la croissance de la souche étudiée. La température et le temps d'incubation doivent être adaptés en fonction de la bactérie étudiée.

B] TECHNIQUE DE BROSSAGE

Exemple le brossage de planche en bois

Pour le décrochage par brossage, une surface de 10 cm² (4 x 2,5 cm) de la planche en bois est délimitée avec un ruban adhésif désinfecté à l'alcool (70°). Après le dépôt d'un diluant (*Ringer*, solution au 1/4) contenant du *Tween 80* (2 g/l) et de l'Agar (3 g/l), la surface est brossée à l'aide d'un dispositif approprié (par exemple une brosse à dents medium, préalablement stérilisée, dix fois horizontalement et dix fois verticalement) (photo ci-dessous).



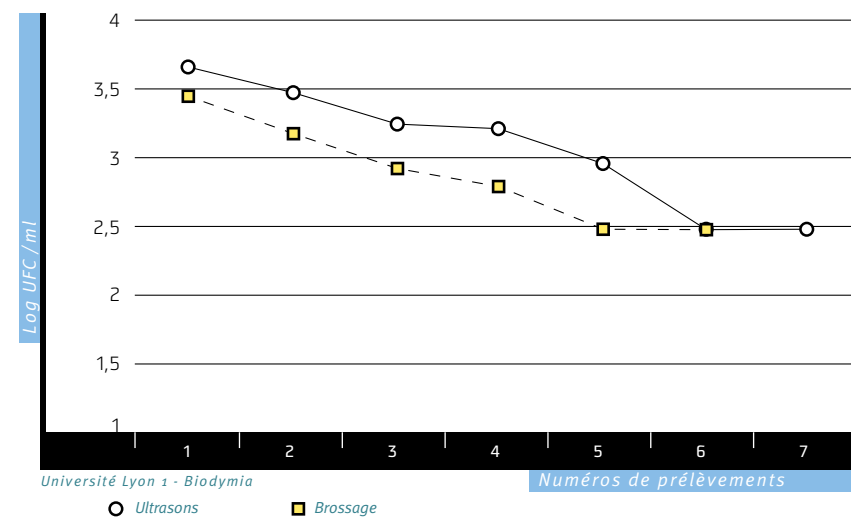
6] Matériel pour le prélèvement par brossage (Université Lyon 1 - Biodymia)

Le diluant contenant les microorganismes décrochés est épongé et récupéré à l'aide de chiffonnettes stériles (3 x 3 cm). Celles-ci sont ensuite placées dans un sac *Stomacher* contenant 30 ml de diluant (e.g. *Ringer* dilué au 1/4). Après un passage au *Stomacher*, la suspension de décrochage est placée dans un flacon stérile, elle constitue la solution mère pour les dénombrements microbiologiques.

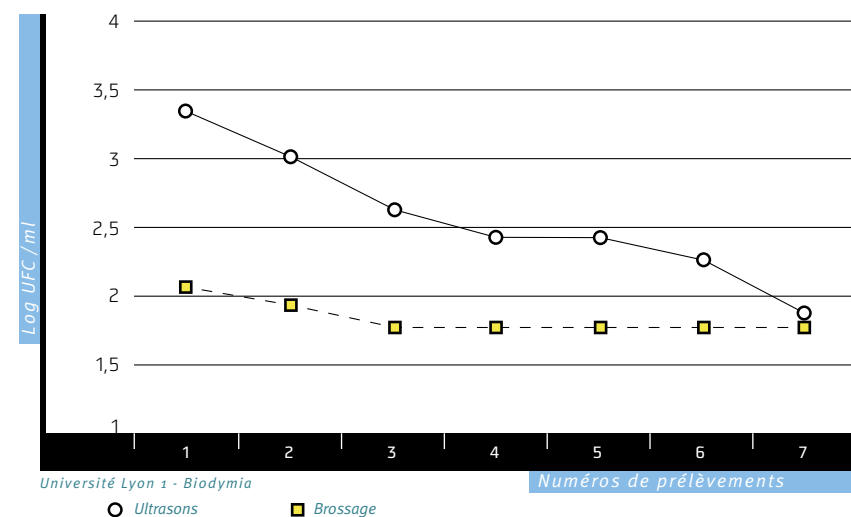
C] EXEMPLES DE RÉSULTATS DE COMPARAISON DES DEUX MÉTHODES DE DÉCROCHAGE

Les pentes de décrochage après prélèvement par ultrasons ou brossage ont été comparées, pour des planches en bois contaminées par différentes flores et après nettoyage. Les résultats obtenus sont présentés sur les schémas 5 à 7.

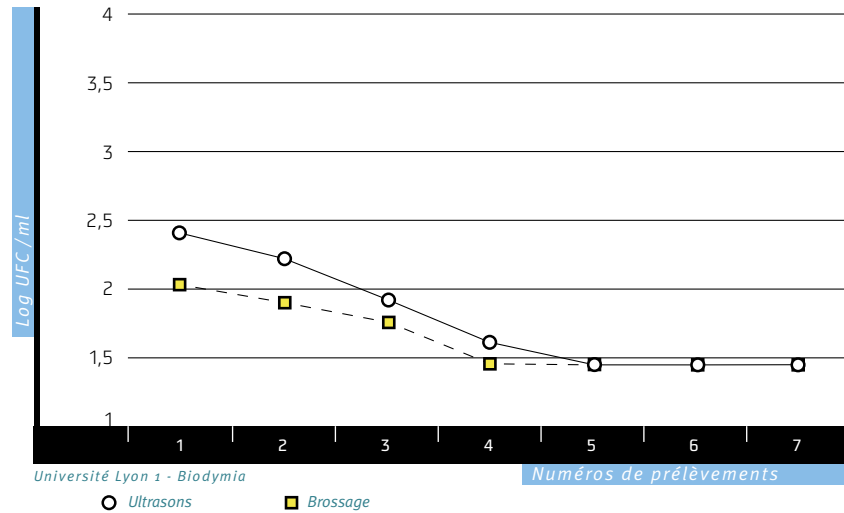
SCHEMA 5] PENTE DE DÉCROCHAGE DE LA FLORE MÉSOPHILE AÉROBIE DE PLANCHE EN BOIS APRÈS NETTOYAGE SUR GÉLOSE PCA



SCHEMA 6] PENTE DE DÉCROCHAGE DE LA FLORE HALOPHILE DE PLANCHE EN BOIS APRÈS NETTOYAGE SUR GÉLOSE - CHAPMAN



SCHEMA 7] PENTE DE DÉCROCHAGE DES LEVURES ET MOISSISSURES DE PLANCHE EN BOIS APRÈS NETTOYAGE SUR GÉLOSE CGA



Dans les exemples présentés ci-dessus, pour les prélèvements sur bois c'est la méthode des ultrasons qui a été retenue en raison d'un gain de temps mais également sur la reproductibilité qui est meilleure que par brossage.

Il est possible de déterminer la contamination surfacique par d'autres méthodes : **Méthodes par empreinte**

Elles regroupent l'ensemble des méthodes consistant à appliquer une gélose (sélective ou non) sur la surface à échantillonner. On réalise en quelque sorte une empreinte de la contamination. Parmi les méthodes utilisables, citons les boîtes de contact (dites aussi boîtes de *Rozier-Pantaléon* ou boîtes *Rodac*) ou encore les lames gélosées. Pour chacun, il convient d'utiliser un milieu de culture adapté au germe recherché.

Méthodes par écouvonnage ou chiffonnage

Elles regroupent l'ensemble des méthodes dont le principe est basé sur le décrochement des micro-organismes par frottement de la surface avec un support (écouvillon ou chiffonnette) qui va récupérer les bactéries détachées de la surface. Le dénombrement des germes après remise en suspension de l'écouvillon ou de la chiffonnette dans un diluant peut s'effectuer par les techniques de microbiologie classique.

Pour un décrochage optimal sur une zone définie, il est recommandé d'utiliser successivement plusieurs écouvillons ou chiffonnettes. Notons que différents travaux ont présenté et comparé ces différentes méthodes [11].

3. Mise en culture directe

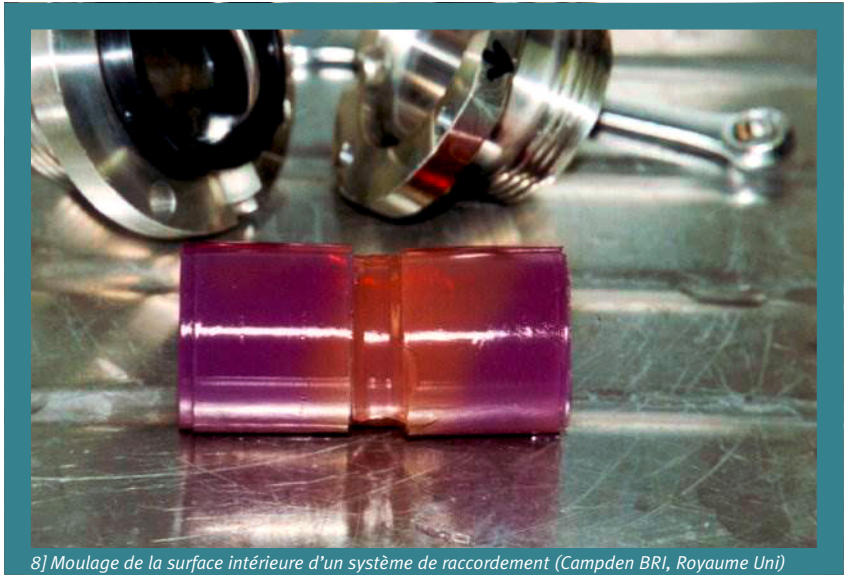
Les dénombrements de la flore adhérente viable cultivable peuvent également être obtenus par mise en contact du milieu nutritif sur la surface à investiguer. Cette méthode par empreinte se distingue des méthodes par boîtes contact ou bilame, par le fait que le milieu gélosé est coulé sous forme liquide (gélose surfondue) directement sur la surface à échantillonner. Le moulage ainsi réalisé est solidifié à température ambiante avant, soit d'être démoulé puis incubé (temps et température fonction des souches étudiées), soit d'être placé (équipement + gélose) en étuve pour incubation, la phase de démoulage se faisant après l'incubation.

La méthode classique d'exploitation repose sur le comptage du nombre de colonies viables cultivées en surface du moulage. La gélose peut être additionnée d'un agent colorant pour faciliter la lecture. Par exemple, sur la photo 7, Les colonies de *Geobacillus stearothermophilus* apparaissent en rouge sur le milieu TSA additionné de chlorure de triphenyltetrazolium⁸. Le résultat est exprimé en UFC par unité de surface. La position des colonies sur le moulage indique de surcroît la position de départ de la colonie dans l'équipement. Le résultat par zone en trois dimensions est donc possible et ne constitue pas simplement une valeur moyenne [9].



7] Contamination résiduelle de la surface d'un bol d'entrée d'échangeur à surface raclée (Inra - PIHM).

⁸ Nutrient broth (13 g.L-1), agar E (15 g L-1) 0,1 % 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC).

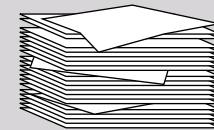


8] Moulage de la surface intérieure d'un système de raccordement (Campden BRI, Royaume Uni)

Une méthode alternative consiste en l'application d'une gélose additionnée d'un indicateur colorimétrique de la croissance et à une exploitation du ratio de gélose virant de couleur (utilisation de grilles ou d'imageries). Sur la photo 8, après incubation, la croissance bactérienne se traduit par un changement de couleur de la gélose du violet au jaune. Cette technique est intéressante pour des équipements et surfaces présentant des anfractuosités profondes (pour les joints par exemple) où les colonies ne seraient pas observables sur le moulage alors que la zone de virage colorimétrique est plus étendue et visible. La contrainte est alors de redécouper à épaisseur constante la gélose et de passer d'une représentation 3D à 2D pour les zones d'intérêt c'est-à-dire entrant en contact avec l'aliment ^{[10]8}.



Annexes



1] Normes

- 1] AFNOR,
NF T72-231, Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau - Détermination de l'activité sporicide - Méthode par filtration sur membranes,
Paris, Afnor, août 1988.
- 2] AFNOR,
NF X50-790, Activités de service de nettoyage industriel - Lexique de la propreté,
Paris, Afnor, décembre 1995.
- 3] AFNOR,
NF EN 14885, Antiseptiques et désinfectants chimiques - Application des Normes européennes relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques,
Paris, Afnor, février 2007.
- 4] AFNOR,
NF V08-250, Microbiologie des aliments - traitements thermiques préalables au dénombrement ou à la recherche de spores bactériennes,
Paris, Afnor, février 2010.
- 5] AFNOR,
NF V08-602, Microbiologie des aliments - Dénombrement des spores dans les produits alimentaires avant traitement d'appertisation par comptage des colonies,
Paris, Afnor, mai 2011.
- 6] AFNOR,
NF EN ISO 20743: 2013, textiles - Détermination de l'activité antibactérienne des produits textiles,
Paris, Afnor, septembre 2013.

2] Ouvrages généraux

- 7] ANDRÉ (S.), HÉDIN (S.), REMIZE (F.), ZUBER (F.),
Evaluation of peracetic acid sanitizers efficiency against spores isolated from spoiled cans in suspension and on stainless steel surfaces,
Des Moines USA, International Association for Food Protection, *Journal of Food Protection*, 75 (2), février 2012, p. 371-375.
- 8] BÉNÉZECH (T.), BOURION (F.), CARPENTIER (B.), CURIEL (G.-J.), FAILLE (C.), GUSTAVSSON (P.), HERMON (C.), HOFMANN (J.), KASTELEIN (J.), KOLD (J.), TIMPERLEY (A.-W.), WIRTANEN (G.),
Méthodes d'évaluation de l'aptitude au nettoyage en place d'équipements pour les industries alimentaires,
Laval, Guide technique EHEDG, doc 2, 3^e édition, juillet 2004 complétée juin 2007.
- 9] BÉNÉZECH (T.), LELIÈVRE (C.), MEMBRÉ (J.M.), VIET (A.-F.) ET FAILLE (C.),
A new test method for in-place cleanability of food processing equipment,
Philadelphia, Elsevier, *Journal of Food Engineering*, Vol 54(1), août 2002, P. 7-15.
- 10] CHADEAU (E.),
Caractérisation des propriétés antimicrobiennes de textiles fonctionnalisés avec de l'argent ou du PolyHexaMéthylène Biguanide (PHMB),
Lyon, thèse université Claude-Bernard Lyon 1, 15 février 2011, 317 p.
- 11] DENIS (C.), REITZ-AUSSER (J.), CHAMBA (J.-F.), CASAREGOLA (S.), THIERRY (A.) ET AL,
La conservation des souches d'intérêt laitier, procédure de gestion des collections et modes opératoires de congélation,
Réseau des collections françaises de micro-organismes d'intérêt laitier, Paris, Arilait Recherches, Maison du Lait, novembre 2007, 47 p.
- 12] GARRY (P.),
Validation des opérations de nettoyage et de désinfection en IAA,
Salles propres, n° 75, 1^{er} septembre 2011, p. 40-46.
- 13] GRAND-DESCHAMPS (I.),
Effet des matériaux et états de surface sur l'efficacité des procédés de désinfection - Application à la désinfection de matériaux civils et militaires contaminés délibérément par des agents biologiques,
Paris, thèse AgroParistech, 2010.
- 14] MARIANI (C.),
*Écologie microbienne des biofilms présents à la surface des planches d'affinage en bois de l'AOC « Reblochon de Savoie » et effet inhibiteur vis-à-vis de *Listeria monocytogenes**,
Paris, thèse AgroParistech, 19 mars 2007, 369 p.
- 15] MIDELET (G.) ET CARPENTIER (B.),
*Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes* from various materials to beef*,
Washington, ASM Journal Press Releases, *Applied and Environmental Microbiology*, n° 68, août 2002, p. 4015-4024.
- 16] OULAHAL-LAGSIR (N.), MARTIAL-GROS (A.), BOISTIER-MARQUIS (E.), BLUM (L.-J.) ET BONNEAU (M.),
The development of an ultrasonic apparatus for the non-invasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment,
Oxford, Blackwell Publishing, *Letters in Applied Microbiology*, n° 30(1), janvier 2000, p. 47-52.
- 17] OULAHAL-LAGSIR (N.), MARTIAL-GROS (A.), BONNEAU (M.) ET BLUM (J.-L.),
*« *Escherichia coli*-milk » biofilm removal from stainless steel surface : synergism between ultrasonic waves and enzymes*,
Oxon, Taylor & Francis, *Biofouling (The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research)*, n° 19, juin 2003, p. 159-168.
- 18] PEREZ-RODRIGUEZ (F.), VALERO (A.), CARRASCO (E.), GARCIA-GIMENO (R.-M.) ET ZURERA (G.),
Understanding and modelling bacterial transfer to foods : a review,
Philadelphia, Elsevier, *Trends in Food Science and Technology*, vol. 19 issue 3, mars 2008, p. 130-144.
- 19] PRAKASH (B.), VEEREGOWDA (B.-M.) & KRISHNAPPA (G.),
Biofilms : A survival strategy of bacteria,
Bengaluru (Inde), *Current Science*, n° 85, novembre 2003, p. 1299-1307.
- 20] SINGLETON (P.) ET SAINSBURY (D.),
Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,
Chichester, John Wiley & Sons, septembre 2006, 3^e édition, 908 p.

21] VAILLANT (V.), DE VALK (H.) ET BARON (E.),
Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France,
Saint-Maurice, Institut de Veille Sanitaire, mars 2004, 192 p.

ADHÉRENCE

État d'une chose qui adhère à une autre.

ADHÉSION

Phénomène physique et/ou chimique impliquant une énergie d'interactions et conduisant à la formation d'une liaison adhésive créant l'état d'adhérence. L'adhésion microbienne conduit à une structure bidimensionnelle.

ADSORPTION

Accumulation de molécules à une interface (solide, gazeuse ou liquide) à une concentration supérieure à celle se trouvant dans le volume.

AÉRODIFFUSION

Diffusion par un aérosol d'une particule inerte ou biologique (bioaérosol).

BIOCONTAMINATION

Contamination par un ou des agents biologiques.

BIOFILM

Structure tridimensionnelle plus ou moins cohésive constituée de bactéries adhérentes s'étant multipliées et pouvant être incluses dans une matrice exopolymérique.

BIOFILM

Transfert de contaminants biologiques.

CONDITIONNEMENT D'UNE SURFACE

Modification d'une surface par adsorption moléculaire et/ou macromoléculaire.

DÉCONTAMINATION

Opération au résultat momentané permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables (NF T 72-101).

DÉSINFECTANT

Produit capable d'opérer une désinfection chimique (NF EN 14 885).

DÉSINFECTION

Opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés (NF T 72-101).

DÉTERGENCE

Processus selon lequel des salissures sont détachées de leur substrat et mises en solution ou en dispersion (NF X 50-790).

DÉTERGENT

Produit dont la composition est spécialement étudiée selon un processus mettant en œuvre les phénomènes de détergence (NF X 50-790).

NETTOYAGE

Ensemble des opérations permettant d'assurer un niveau de propreté, d'aspect, de confort et d'hygiène faisant appel dans des proportions variables, aux facteurs combinés suivant : action chimique, action mécanique, température, temps d'action (NF X 50-790).

NETTOYABILITÉ

Aptitude au nettoyage.

ŒSE

Petit instrument utilisé en microbiologie pour la réalisation de cultures et constitué, en une de ses extrémités, d'une petite anse en platine (ou en plastique).

RUGOSITÉ

État du caractère rugueux d'une surface.

SOUCHOTHÈQUE

Collection référencée de souches microbiennes.

STÉRILISATION

Procédé tendant à l'élimination de toute vie microbienne (bactéries, levures, virus...).

SURFAÇAGE

Traitement de surface physique ou chimique conduisant à un état de surface défini en termes de rugosité, de composition chimique ou encore de caractéristiques physico-chimiques.

SURFAÇAGE HYDROPHOBE

Surface ayant peu ou pas d'affinité pour l'eau.

SURFAÇAGE HYDROPHILE

Surface ayant beaucoup d'affinité pour l'eau.

TOPOGRAPHIE

Représentation tridimensionnelle d'une surface.

Abréviations

BHI

Brain Heart Infusion

EAU θ

Eau physiologique (eau additionnée de Chlorure de sodium (NaCl) à 9 g/L).

EHEDG

European Hygienic Engineering and Design Group.

EPS

Exopolysaccharide.

G

Accélération ou force centrifuge.

GÉLOSE CGA

Gélose glucosée au chloramphénicol.

HR

Humidité relative.

m / v

Masse /volume.

mM

Millimolaire.

PBS

Phosphate buffer sodium.

RÉSOMIL

Réseau de micro-organismes d'intérêt laitier.

RMT

Réseau mixte technologique.

RX

x^e repiquage.

SFC

Spore formant colonie.

θ

Angle de contact.

TSB

Tryptone Soy Broth.

UFC

Unité formant colonie.

VNC

Viable non cultivable.

v / m

Volume /masse.

v / v

Volume /volume.

ACTIA

Le réseau français des Instituts techniques de l'agro-alimentaire
16 rue Claude-Bernard, 75 231 Paris Cedex 05
Téléphone : 01 44 08 86 20, www.actia-asso.eu

Les partenaires du RMT Actia Chlean

Instituts techniques agro-industriels



ACTALIA

Pôle agro-alimentaire, rue Popielujko, 50 000 Saint-Lô
Téléphone : +33 (0)2 33 06 71 71
Courriel : actalia@actalia.eu. www.actalia.eu

ADIV

Association pour le développement de l'institut de la viande
10 rue Jacqueline-Auriol, ZAC du Parc industriel Gravanches
63 039 Clermont-Ferrand Cedex 2
Téléphone : +33 (0)4 73 98 53 80
Courriel : adiv@adiv.fr. www.adiv.fr

ADRIA DÉVELOPPEMENT

*Association pour le développement et la recherche appliquée
aux industries agricoles et alimentaires*
Z.A. Creac'h Gwen, 29 196 Quimper Cedex
Téléphone : +33 (0)2 98 10 18 18
Courriel : adria.developpement@adria.tm.fr, www.adria.tm.fr

CTCPA

Centre technique de la conservation des produits agricoles
44 rue d'Alésia. 75 682 Paris Cedex 14
Téléphone : +33 (0)1 53 91 44 44
Courriel : ctcpa@ctcpa.org, www.ctcpa.org

IFIP

Institut du porc
3-5 rue Lespagnol, 75 020 Paris, téléphone : +33 (0)1 58 39 39 50
Courriel : ifip@ifip.asso.fr, www.ifip.asso.fr

IFV

Institut français de la vigne et du vin
46 avenue Gustave-Eiffel, 37 100 Tours, téléphone : 02 47 88 24 20
Courriel : contact@vignevin.com, www.vignevin.com

Centres interface

CRITT PROVENCE-ALPES-CÔTE D'AZUR

Cité de l'Alimentation, rue Pierre-Bayle - B.P. 11 548
84 916 Avignon Cedex 9, téléphone : +33 (0)4 90 31 55 08
Courriel : contact@critt-iaa-paca.com. site web : www.critt-iaa-paca.com

Centres techniques

ADRIANOR

*Association pour le développement de la recherche
appliquée aux industries alimentaires des régions du Nord*
Rue Jacquart, ZI Est-Arras, 62 217 Tilloy-lès-Mofflaines
Téléphone : +33 (0)3 21 24 81 03
Courriel : cchene.adrianor@orange.fr, www.adrianor.com

CASIMIR

24 avenue des Landais, B.P. 154, 63 173 Aubière Cedex
Téléphone : +33 (0)4 73 28 85 28
Courriel : casimir@casimir.org, www.casimir.org

Organismes publics

ANSES

*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail*
Boulevard Bassin-Napoléon, 62 200 Boulogne-sur-Mer
Téléphone : +33 (0)3 21 99 25 00,
Courriel : graziella.bourdin@anses.fr

Enseignement & recherche

AGROPARISTECH

Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement
25 avenue de la République, 91 300 Massy
Téléphone : +33 (0)1 69 93 51 47
Courriel : marie-noelle.bellon-fontaine@agroparistech.fr

CETIM

Centre technique des industries mécaniques
74 route de la Jonelière, B.P. 82 617, 44 326 Nantes Cedex 3
Téléphone : +33 (0)2 40 37 36 35
Courriel : daniel.pierrat@cetim.fr, www.cetim.fr

ÉNIL DE MAMIROLLE

15 Grand-Rue, 25 620 Mamirolle
Téléphone : +33 (0)3 81 55 92 00
Courriel : patrice.dieudonne@educagri.fr

INRA

Institut national de recherche agronomique
369 rue Jules-Guesde, B.P. 20 039, 59 651 Villeneuve-d'Ascq Cedex
Téléphone : +33 (0)3 20 43 54 24
Courriel : thierry.benezech@lille.inra.fr

LYCÉE AGRICOLE DE LAVAL

321 route de Saint-Nazaire, B.P. 81 319, 53 013 Laval Cedex
Téléphone : +33 (0)2 43 68 24 93
Courriel : karine.boutroux@educagri.fr

UNIVERSITÉ LYON 1 BIODYMIA

IUT Lyon 1, Technopôle Alimentec, rue Henri-de-Boissieu
01000 Bourg-en-Bresse, téléphone : +33 (0)4 74 47 21 41
Courriel : nadia.oulahal@univ-lyon1.fr



Conception graphique & exécution

Anne-Lise Dermenghem - Actia

Illustration de couverture

Anne-Lise Dermenghem - Actia

Cet ouvrage est composé en

Méta et Parisine

Éditeur

Actia

16 rue Claude-Bernard

75 231 Paris Cedex 05

Téléphone : 01 44 08 86 20

Légende

[📖] 33 : référence bibliographique n° 33

[👁] : voir

ONT PARTICIPÉ À LA RÉALISATION DE CET OUVRAGE

COORDINATION

<i>M.-N. Bellon Fontaine</i>	AGROPARITECH	<i>marie-noelle.bellon-fontaine@agroparistech.fr</i>
<i>Alice Dulas</i>	ACTIA	<i>a.dulas@actia-asso.eu</i>
<i>Pascal Garry</i>	IFREMER	<i>pascal.garry@ifremer.fr</i>
<i>Christophe Hermon</i>	CTCPA	<i>chermon@ctcpa.org</i>

CO-AUTEURS

<i>Stéphane André</i>	CTCPA	<i>sandre@ctcpa.org</i>
<i>Catherine Denis</i>	ACTALIA	<i>c.denis@actalia.eu</i>
<i>Patrice Dieudonné</i>	ÉNIL MAMIROLLE	<i>patrice.dieudonne@educagri.fr</i>
<i>Bastien Frémaux</i>	IFIP	<i>bastien.fremaux@ifip.asso.fr</i>
<i>Véronique Huchet</i>	ADRIA DÉVELOPPEMENT	<i>veronique.huchet@adria.tm.fr</i>
<i>Éric Notz</i>	ACTALIA	
<i>Nadia Oulahal</i>	UNIV. LYON 1 - BIODYMIA	<i>nadia.oulahal@univ-lyon1.fr</i>
<i>Nicolas Pernet</i>	ACTALIA	
<i>Florence Postollec</i>	ADRIA DÉVELOPPEMENT	<i>florence.postollec@adria.tm.fr</i>
<i>Marina Rivollier</i>	ADIV	
<i>Nicolas Rossi</i>	ACTALIA	<i>n.rossi@actalia.eu</i>

L'ACTIA coordonne les activités des Instituts techniques agro-industriels (ITAI) et des Centres interface, dont les 1 200 chercheurs, ingénieurs et techniciens accompagnent quotidiennement les entreprises agro-alimentaires.

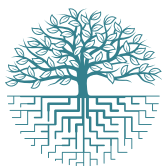
ACTIA

Le réseau français des instituts techniques de l'agro-alimentaire

16 rue Claude-Bernard, 75231 Paris Cedex 05

Tél.: 33 (0)1 44 08 86 20, Fax: 33 (0)1 44 08 86 21, Courriel: actia@actia-asso.eu

Site web: www.actia-asso.eu



ACTIA