



SYNTHESES DE COLLOQUES

4^{ème} Réunion européenne

“ Adhésion des microorganismes aux surfaces ”

Adhésion, biofilms, nettoyage et désinfection

Organisées par l'Université Paris-Sud et
l'Institut National de la Recherche Agronomique

Massy, 27-28 mars 2000

Nous publions ici les résumés d'une sélection d'interventions.

Sommaire

Influence de l'adhésion des bactéries aux supports sur l'activité bactéricide de désinfectants , par S. Bouttier, C. Labarre et J. Fourniat	296
Choix des paramètres de rugosité pour caractériser le statut hygiénique de surfaces en acier inoxydable , par C. Faille, B. Carpentier, M.N. Bellon-Fontaine, J.M. Membré, G.Vasseur, T.Benezech, M.A. Laroche	296
Fixation et survie des aérosols bactériens sur les surfaces , par Enric Robine.....	297
Influence d'un biosurfactant produit par une souche de <i>Pseudomonas</i> sur l'adhésion de <i>Listeria monocytogenes</i> L028 : aspects physico-chimiques , par T. Meylheuc, C.J. Van Oss et M.N. Bellon-Fontaine	298
Propriétés physico-chimiques de surface de cinq souches de <i>Listeria monocytogenes</i> isolées de la filière porcine – relation avec le génotype et influence de la température de croissance , par Inès Giovannacci, Gwennola Ermel, Jean-Luc Venduvre et Marie-Noëlle Bellon-Fontaine	298

Influence de l'adhésion des bactéries aux supports sur l'activité bactéricide de désinfectants

S. BOUTTIER, C. LABARRE et J. FOURNIAT

Faculté de pharmacie, Laboratoire de microbiologie industrielle, 5 rue Clément, 92296 Chatenay Malabry Cedex

L'efficacité des désinfectants vis-à-vis des bactéries incluses dans un biofilm a été largement étudiée et la résistance de ces bactéries aux agents anti-microbiens est bien connue. Cette résistance est attribuée selon les auteurs à divers facteurs (pouvoir protecteur de la matrice, état physiologique des bactéries, ...). L'action des désinfectants vis-à-vis des bactéries adhérentes à des supports inertes après des temps courts durant lesquels elles n'ont pu former un réel biofilm (temps inférieurs à 24 heures) est beaucoup moins étudiée. Cette situation reflète pourtant des cas fréquents, aussi bien en milieu industriel qu'en milieu médical, où les opérations de nettoyage-désinfection sont effectuées peu après une éventuelle contamination.

Au cours de nos travaux, nous avons étudié l'action de deux désinfectants, l'hypochlorite de sodium (solution à 12°Chl) et le chlorure de benzalkonium vis-à-vis de bactéries adhérentes (*Escherichia coli* CIP 54127 et *Staphylococcus aureus* 601) à deux supports inertes (verre et Téflon). Pour les deux souches bactériennes en contact avec les supports durant 3, 6 ou 24 h, aucune diminution de l'efficacité de la solution d'hypochlorite de sodium n'est observée. Pour le chlorure de benzalkonium, lorsque les bactéries sont adhérentes au verre, une réduction de l'efficacité de ce désinfectant est observée (2 à 4 fois), réduction pouvant s'expliquer par la moindre accessibilité des bactéries du fait de leur adhésion. Lorsque les bactéries sont adhérentes au Téflon, une fraction de la population de la souche de *S. aureus* n'est pas éliminée par le désinfectant même avec une concentration en désinfectant 40 fois supérieure à la concentration minimale bactéricide vis-à-vis des mêmes bactéries en suspension. Cette fraction est d'autant plus importante que le temps d'adhésion est court. Pour *E. coli* CIP 54127, le même phénomène est observé, mais la fraction de la population survivante est moins importante. La différence observée entre les 2 supports pourrait être due à une modification des propriétés de surface des bactéries liée à l'adhésion à un support hydrophobe.

Choix des paramètres de rugosité pour caractériser le statut hygiénique de surfaces en acier inoxydable

C. FAILLE(1), B. CARPENTIER(3), M.N. BELLON-FONTAINE(2), J.M. MEMBRE(1), G. VASSEUR(4), T. BENEZECH(1), M.A. LAROCHE(4)

(1) INRA Laboratoire de Génie des Procédés et Technologie Alimentaire, 369 rue Jules Guesde, BP 39, 59651 Villeneuve d'Ascq Cedex

(2) INRA Laboratoire de Bioadhésion et d'Hygiène des Matériaux, 25 avenue de la République, 91300 Massy

(3) AFSSA-LERPAC, BP 332, 94709 Maisons-Alfort Cedex

(4) CETIM, 52 avenue Félix Louat, BP 37, 60304 Senlis Cedex

Dans l'industrie agro-alimentaire, de nombreux micro-organismes adhèrent aux surfaces des équipements et peuvent entraîner la contamination des produits alimentaires en contact avec ces surfaces. Ces micro-organismes adhérents s'avèrent de plus difficiles à éliminer car ils semblent alors acquérir des propriétés de résistance accrue à divers traitements (température, désinfectants, etc.). Dès lors, il est essentiel de définir les paramètres limitant l'adhésion de ces micro-organismes ou facilitant leur nettoyage, c'est-à-dire décrivant le statut hygiénique des équipements et des surfaces. Le paramètre le plus souvent évoqué pour définir la topographie de surface est la rugosité moyenne RA. Des valeurs maximales acceptables ont depuis peu été définies dans des normes (ISO 4287), ou des recommandations faites par le Groupement Européen pour la Conception Hygiénique des Equipements (EHEDG).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au statut hygiénique de 16 surfaces d'acier inoxydable fournies par le CETIM (AISI 316L avec différents finis de surface, utilisés pour la fabrication des pompes). Les matériaux ont tout d'abord été classés par comparaison de leur relative propreté microbiologique après avoir subi un cycle d'encrassement – nettoyage. Un plan en blocs incomplets équilibré a été établi pour permettre de comparer le statut hygiénique de chaque couple d'échantillons.

Pour cela, les coupons ont été encrassés par une souillure mixte, composée de spores de *Bacillus cereus* (10⁶ spores par coupon) et de sauce béchamel (200 µl). Après séchage, les coupons sont introduits dans des tubes à section rectangulaire, qui sont insérés dans une boucle de nettoyage en place (NEP). Une procédure de NEP classique est menée : 1) rinçage, 2) nettoyage au Galor 7/32 (CFPI, France) à 50°C, 3) rinçage. Les spores encore adhérentes

après NEP sont décrochées des surfaces par sonification puis dénombrées sur gélose nutritive.

La population résiduelle (logN) était comprise entre 3,65 et 4,72. Par comparaison multiple de moyennes il a été possible de dégager différents groupes de matériaux hygiéniques et non hygiéniques.

Nous avons alors analysé l'influence de différents paramètres sur le statut hygiénique de ces surfaces d'acier. Nous avons retenu les énergies libres de surfaces, et 10 paramètres de rugosité standardisés. Une procédure d'élimination automatique des variables (logiciel SAS) a immédiatement éliminé les énergies libres de surface, sans doute à cause de l'homogénéité des matériaux testés. Cette procédure a, par contre, permis de retenir 4 variables de rugosité pouvant influencer le statut hygiénique : R_A (rugosité moyenne arithmétique), R_p (hauteur de saillie maximale), R_{PK} (hauteur de pic réduite), R_{VK} (profondeur de creux réduite).

Ces travaux confirment donc l'influence majeure de la topographie de surface sur le caractère hygiénique des matériaux. A la lumière de cette étude, la variable R_A seule apparaît nettement insuffisante pour prendre en compte la topographie des matériaux. Des observations en microscopie électronique à balayage démontrent les limites de cette variable : une même valeur peut être obtenue pour des profils ondulants (bonne hygiène) et des profils très irréguliers (mauvaise hygiène).

Fixation et survie des aérosols bactériens sur les surfaces

Enric ROBINE(a)(b)

(a) Université Paris XII, UFR Sciences, Microbiologie appliquée, av. du Général de Gaulle, 94010 Créteil.

(b) Centre scientifique et technique du bâtiment, 84 av. J. Jaurès, 77421 Marne-la-Vallée Cedex 02

La survie des micro-organismes dans les milieux naturels est liée en grande partie à leur aptitude à coloniser les surfaces. C'est notamment le cas des environnements intérieurs où des bactéries saprophytes peuvent se développer au détriment des matières organiques contenues dans les produits de construction et de décoration (papiers peints, pous-

sières, humidificateurs, conduites de ventilation...). Le risque associé à la croissance des bactéries aéroportées sur les matériaux de construction est reconnu comme un problème d'hygiène et de santé publique, notamment dans les environnements intérieurs avec certains secteurs sensibles (les établissements de soins et les industries agroalimentaires).

L'objectif du travail présenté vise l'étude de l'adhésion et de la survie de deux aérosols bactériens (*Enterococcus faecalis* IP 10.30.15 et *Pseudomonas fluorescens* IP 56.90) sur trois supports inertes (verre, polychlorure de vinyle et acier inoxydable). Nos recherches ont mis en évidence un certain nombre de facteurs qui influencent l'adhésion et la survie des bactéries sur les surfaces. Il apparaît clairement que la nature et le relief des supports d'accueil des bactéries influencent fortement la fixation et la survie des germes.

D'un point de vue pratique, en matière de contrôle de l'hygiène en quelque milieu que ce soit, il serait nécessaire d'engager une réflexion sur l'utilisation de supports moins "réceptifs" avant de parler de nettoyabilité des matériaux. L'environnement immédiat des microorganismes est également très important, puisque les milieux humides favorisent l'adhésion des cellules aéroportées et qu'inversement l'humidité a une action létale sur ces cellules si les supports sont exempts de nutriments. En revanche, dans les mêmes conditions, la déshydratation ou plus généralement les milieux secs augmentent jusqu'à plusieurs semaines la survie des cellules immobilisées. L'apport ultérieur de nutriments, même en très faibles quantités, et l'augmentation de l'humidité relative suffisent à assurer la reviviscence de ces microorganismes quiescents.

Influence d'un biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas* sur l'adhésion de *Listeria monocytogenes* LO28 : aspects physico-chimiques

T. MEYLHEUC(1), C.J. VAN OSS(2) et M.N. BELLON-FONTAINE(1)

(1) INRA, Unité de Bioadhésion et d'Hygiène des Matériaux, 25 av. de la République, 91300 Massy

(2) Department of Microbiology, State University of New-York, Buffalo, NY 14214 USA

Divers micro-organismes tels que *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. ou *Lactobacillus* sp. sont capables de produire des agents actifs de surface, les biosurfactants, qui modifient les propriétés des surfaces ou des interfaces d'un système. Des études récentes ont montré que ces tensioactifs biologiques pouvaient inhiber l'adhésion de germes uropathogènes à la surface de cathéters urinaires. Par ailleurs, de récents travaux ont démontré que la présence d'une souche de *Streptococcus thermophilus* productrice de biosurfactant pouvait abaisser de 85% le niveau d'adhésion initiale de *Candida albicans* à la surface de prothèses vocales. L'adhésion microbienne aux surfaces solides étant un phénomène gouverné essentiellement par les caractéristiques physico-chimiques du microorganisme, du liquide et du substratum, des modifications des propriétés des surfaces de ce dernier par des molécules de biosurfactant pourraient alors modifier l'adhésion microbienne. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'explorer l'influence de molécules biosurfactantes produites par une souche de *Pseudomonas fluorescens* sur l'adhésion d'une bactérie pathogène responsable de toxi-infections alimentaires : *Listeria monocytogenes* LO28 à la surface de polytétrafluoroéthylène (PTFE) et d'acier inoxydable AISI 304. La production de biosurfactant était obtenue par une nouvelle technique simple et originale, basée sur le mode de culture sur gélose nutritive. Les essais d'adhésion étaient réalisés avec des cellules de *L. monocytogenes* cultivées à 20°C ou à 37°C.

Les résultats obtenus ont démontré, quelle que soit la température de croissance, un comportement substratum-dépendant de *L. monocytogenes* LO28 ; avec un plus grand nombre de cellules adhérentes à l'acier inoxydable qu'au PTFE. Parallèlement,

nous avons observé qu'un préconditionnement de l'acier inoxydable avec le biosurfactant conduisait à une diminution de plus de 90% du nombre de cellules viables adhérentes de *L. monocytogenes* LO28. Cet effet peut être lié à la modification des propriétés énergétiques du support, et plus particulièrement à l'augmentation de son caractère donneur d'électron. La diminution significative de l'adhésion microbienne moyenne obtenue par l'adsorption préalable de biosurfactants sur les surfaces pourrait donc constituer un nouveau moyen de lutte efficace contre l'implantation de germes pathogènes dans les ateliers des industries agro-alimentaires.

Propriétés physico-chimiques de surface de cinq souches de *Listeria monocytogenes* isolées de la filière porcine – relation avec le génotype et influence de la température de croissance

Inès GIOVANNACCI(1), Gwennola ERMEL(3),

Jean-Luc VENDEUVRE(1) et Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE(2)

(1) CTSCCV, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort

(2) INRA, Unité de Bioadhésion et d'Hygiène des Matériaux, 25 av. de la République, 91300 Massy

(3) AFSSA, Unité d'Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, B.P. 53, 22440 Ploufragan

Plusieurs travaux ont souligné l'importance de l'origine environnementale dans la contamination des carcasses et produits de découpe de porc par *Listeria monocytogenes*. Les contaminations croisées ont principalement lieu par le biais de surfaces rencontrées dans les locaux de ressuyage (température moyenne d'exploitation : 4°C) et dans les ateliers de découpe (10°C). Or, l'adhésion des bactéries aux surfaces, qui peut évoluer ultérieurement vers la formation de biofilms sources de contaminations, est, à l'origine, un phénomène de nature purement physico-chimique.

Les propriétés physico-chimiques de surface de cinq isolats de *Listeria monocytogenes* provenant d'abattoirs et d'ateliers de découpe de porc, préalablement sérotypés et caractérisés par pulstypage (*ApaI*), ont été déterminées. Trois isolats, dont deux de sérotype 1/2a et un de sérotype 3a, étaient fortement reliés alors que les deux autres, de sérotypes 1/2a et 1/2c, étaient éloignés entre eux et

par rapport aux trois autres. La caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface a été effectuée après croissance en milieu BHI (Oxoïd) après deux repiquages successifs à 37°C et croissance finale à 37°C, 10°C ou 4°C. Des mesures de mobilité électrophorétique en fonction du pH ont été réalisées dans du NaCl 1,5.10⁻³ M (Zétamètre Séphy, France). Les interactions de Van der Waals et acido-basiques ont été évaluées par le test MATS (Microbial Adhesion To Solvents) dans du NaCl 0,15 M (absence d'interactions électrostatiques).

Après croissance à 37°C, les cinq isolats ont montré un caractère basique accompagné d'une forte électronégativité de surface avec absence de point isoélectrique. Toutefois, les surfaces des cinq isolats sont apparues de hydrophobes à hydrophiles, avec un caractère basique plus ou moins marqué. Ainsi, la diversité génomique observée au sein d'isolats de *Listeria monocytogenes* issus de la filière porcine s'accompagne également d'une variabilité des propriétés physico-chimiques de

surface exprimée après croissance à 37°C, ce qui laisse supposer des différences vis-à-vis de l'aptitude à adhérer aux surfaces.

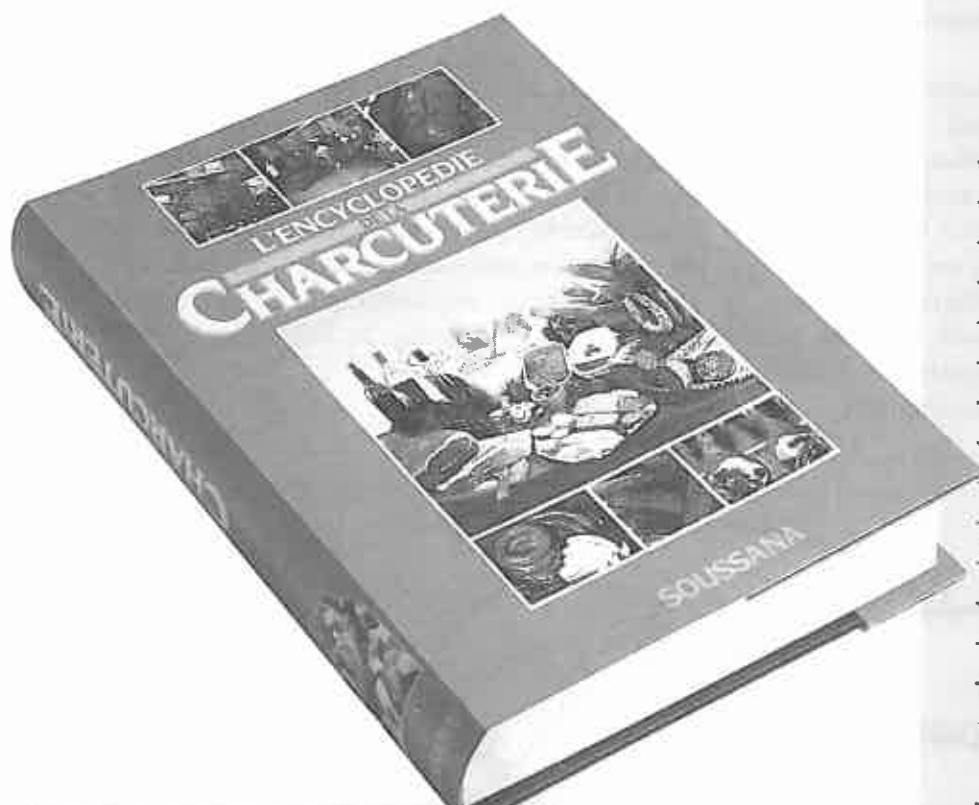
La variabilité de propriétés de surface tend à s'atténuer lorsque la température de croissance diminue. En effet, la croissance à basses températures (10°C ou 4°C) a entraîné une diminution de l'électronégativité, de l'hydrophobicité ainsi que du caractère basique des isolats. Ces modifications ont été particulièrement marquées après croissance à 4°C.

Les propriétés de surface de cinq isolats de *Listeria monocytogenes*, variés de par leurs sérotypes et génotypes, tendent à devenir similaires après un choc froid et une croissance à basses températures. Ainsi, il semble exister des mécanismes d'adaptation aux basses températures, ayant une influence sur les propriétés physico-chimiques de surface, communs aux cinq isolats de *Listeria monocytogenes* étudiés.



L'ENCYCLOPEDIE DE LA CHARCUTERIE

A nouveau en vente



**865 PAGES et
1315 RUBRIQUES**

22x29 cm

Nombreux tableaux

Figures et illustrations en couleur

Editions SOUSSANA 1990

DES THEMES MULTIPLES...

ADDITIFS
BIOCHIMIE
BOYAUX ARTIFICIELS
BOYAUX NATURELS
CINQUIEME QUARTIER
CONDITIONNEMENT
CONSERVES
CONTROLE
DECORATION
FOIE GRAS
HYGIENE - SANTE PUBLIQUE
INGENIERIE
INGREDIENTS
JAMBONS CUITS
MATERIEL
MATIERES PREMIERES
CARNEES
MICROBIOLOGIE
OPERATIONS
TECHNOLOGIQUES
PATISSERIE CHARCUTIERE
POISSONS
PRODUITS DE
CHARCUTERIE CRUS ET SECS
PRODUITS DE
CHARCUTERIE CUITS

En vente au CTSCCV au prix de 810,00F TTC

(voir bon de commande en dernière page de ce Bulletin)