

Biofilms en industries charcutières et développement d'un modèle multi-espèces

Fiche 17

Partenariat :
INRAE

Financier :
FranceAgriMer

Contact :
bastien.fremaux@ifip.asso.fr

Valorisation

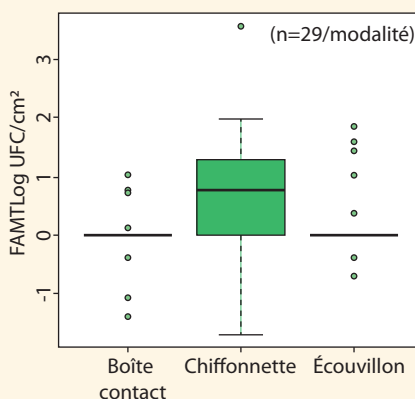
- Rapport de fin d'étude
- Formation IFIP N&D

Contexte et objectifs

Les biofilms sont omniprésents dans l'industrie agroalimentaire. Ils se définissent par une communauté de micro-organismes adhérents à une surface et enrobés dans une matrice d'exopolymères. Cette structure permet notamment aux cellules bactériennes de pouvoir résister aux opérations d'hygiène, rendant problématique leur élimination. La maîtrise de la biocontamination surfacique des équipements constitue une préoccupation majeure des industriels charcutiers et transformateurs de viande. En particulier, ceux produisant des charcuteries cuites consommées en l'état sont fortement sensibilisés à cette problématique. Bien qu'une littérature abondante existe sur les biofilms, les données sont extrêmement limitées concernant les flores microbiennes qui les composent à l'état naturel. Ce travail visait à identifier et décrire les communautés bactériennes présentes sur les surfaces d'installations retrouvées dans les zones sensibles de production de charcuteries cuites consommées en l'état via des méthodes culture-dépendantes et -indépendantes (métagénomique ciblée 16S). A cette fin, le bénéfice d'utiliser une solution enzymatique spécifique de décrochement préalablement aux procédures de prélèvements par frottis (chiffonnette, éponge) ou empreinte (apposition de boîtes contact) a été évalué. Sur la base des données générées, 3 genres bactériens contaminants trouvés majoritaires ont été sélectionnés pour la mise au point *in vitro* d'un modèle de biocontamination surfacique spécifique de l'industrie charcutière.

Résultats

Les surfaces échantillonnées après nettoyage et désinfection au sein de deux entreprises charcutières ont montré une contamination généralement faible en flore aérobie mésophile totale cultivable ($\leq 2,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) mais avec une diversité de genres bactériens identifiés relativement abondante (i.e. 117 genres bactériens différents) comme révélé par métagénomique ciblée 16S des prélèvements analysés et séquençage partiel de l'ADNr 16S des 131 isolats collectés. Parmi les genres identifiés aux deux dates de prélèvements, ceux dominants pour l'entreprise A étaient par ordre décroissant : *Pseudomonas* spp., *Carnobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Rhodococcus* spp. et *Acinetobacter* spp. ; Ceux pour l'entreprise B étaient dans ce même ordre : *Pseudomonas* spp., *Providencia* spp., *Rhodococcus* spp. et *Acinetobacter* spp.. La richesse et l'équitabilité des genres bactériens identifiés étaient variables d'un site prélevé à l'autre, et la diversité d'un site donné pouvait



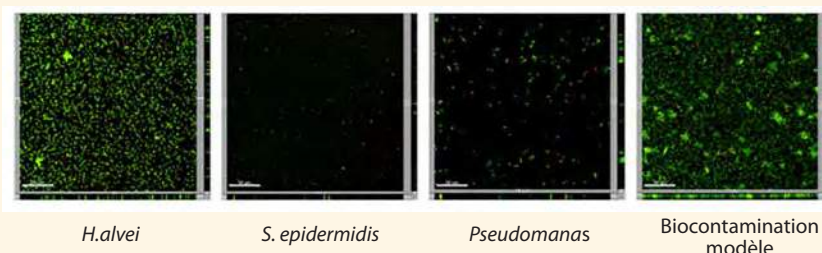
Distribution des résultats de dénombrement de la FAMT obtenus pour l'ensemble des sites échantillonnés, toutes entreprises et dates confondues, en fonction des 3 outils de prélèvement utilisés i.e. boîte contact, chiffonnette et écouvillon

varier entre les dates D1 et D2, démontrant une possible plasticité dans la dynamique des écosystèmes. Tous sites et dates de prélèvement confondus, l'analyse des résultats ramenés au centimètre carré a montré que la chiffonnette permettait d'avoir un taux de récupération en bactéries cultivables significativement supérieur par rapport à la boîte contact ou à l'écouvillon. L'ajout d'enzymes anti-EPSTM en amont du prélèvement ne permettait pas d'accroître dans les conditions testées l'efficacité de décrochage, quelle que soit la technique de prélèvement utilisée ; conséquence certaine de l'absence de biofilm mature sur les surfaces prélevées. Sur la base des données générées, en terme d'abondance (métagénomique ciblée 16S) et de fréquence d'isolement, 1 isolat de *Pseudo-*

monas spp., 1 isolat de *Staphylococcus* spp. et 1 isolat de la famille des entérobactéries ont été choisis pour composer le cocktail servant au développement d'une BS modèle. Le protocole développé incluait le mélange de ces 3 isolats bactériens cultivés sur de l'acier inoxydable à 10°C dans un milieu de culture à base de peptones de viandes (BHI) pendant 7 jours intercalé d'une phase de mise à l'air au 4e jour. L'étude des 3 isolats au sein du modèle de BS développé *in vitro* a mis en évidence des réponses physiologiques spécifiques en fonction des isolats qui pourraient expliquer leur présence sur les surfaces dans un environnement peu propice à leur développement. L'absence de biofilms matures, exempt de matrice exo-cellulaire, sur la majorité des surfaces prélevées montrent par ailleurs qu'elles ont su développer une certaine tolérance aux opérations de nettoyage et désinfection, que l'on peut expliquer par leur inaccessibilité du fait de la rugosité du matériau ou qui relève d'une adaptation physiologique de réponse au stress.

Perspectives

La sélection de souches aux comportements hétérogènes dans le modèle de BS est essentielle pour mieux appréhender la réponse d'un écosystème relativement complexe soumis par exemple à certaines contraintes environnementales telle qu'une exposition à des désinfectants. L'analyse des communautés bactériennes identifiées sur les surfaces pourraient par ailleurs être exploitée de manière combinée avec celles retrouvées en fin de durée de vie sur les produits finis afin de mettre en évidence d'éventuels transferts et l'influence de l'environnement de production sur la qualité microbiologique de ces produits.



Observations au microscope confocal laser à balayage des souches cultivées individuellement et de la biocontamination modèle après 7 jours à 10°C en BHI. Les bactéries vivantes sont colorées en vert (SYTO9) et les bactéries mortes sont colorées en rouge (iodure de propidium). Les reconstructions en 3D ont été obtenues avec le logiciel IMARIS®.