

Journée Découverte de Pilotraite

*Atelier prélèvements et analyses des biofilms :
méthodes, analyses microbiologiques et propriétés
physico-chimiques des surfaces*

Le 12 mai 2022 à Derval (44)
Morgan Guilbaud¹, Valérie Hardit², Valérie Michel³

2



Avec le soutien financier de :

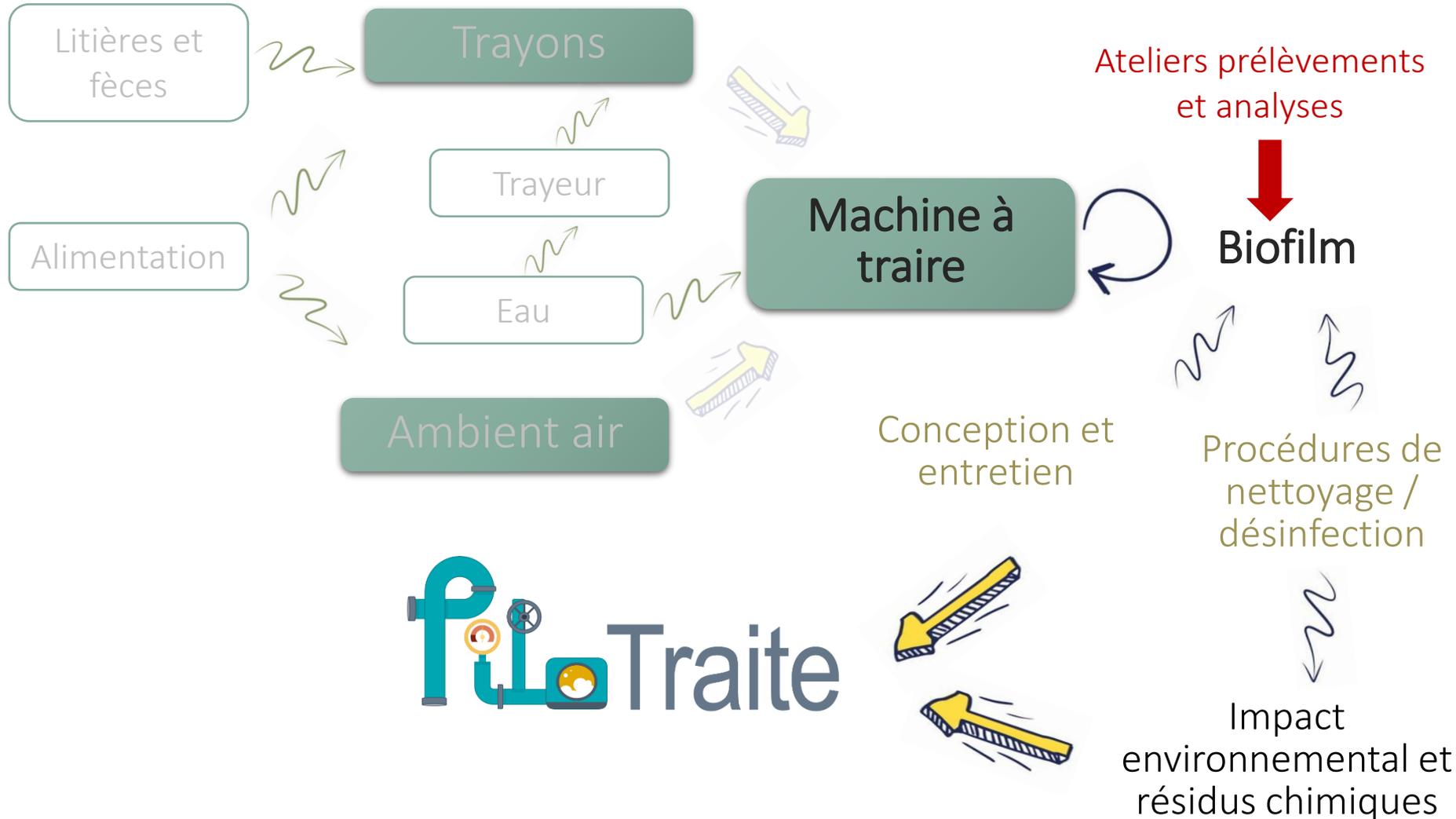


3



Introduction de l'atelier

Biofilms dans la machine à traire



Pourquoi s'intéresser aux méthodes de prélèvements et analyses ?

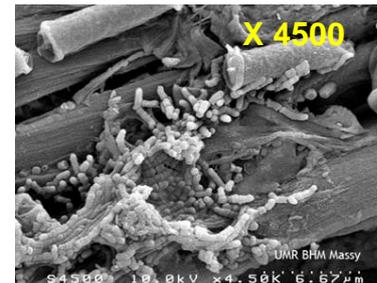
Complexité de la machine à traire

- plusieurs matériaux : inox, caoutchoucs
- circuit non linéaire



Cible biofilm

- micro-organismes : quelques millièmes de mm
- « vivant non visible »



Bactéries en surface de planches d'affinage, microscopie électronique à balayage
source: Mariani et al. 2007

Les rendre visibles

- Appliquer méthodes appropriées
- Pour mettre en évidence différents types de micro-organismes



Pourquoi s'intéresser aux méthodes de prélèvements et analyses ?

Complexité de la machine à traire

- plusieurs matériaux : inox, caoutchoucs
- circuit non linéaire

Impact du matériau support ?
→ **Propriétés physico-chimiques des surfaces**
Morgan GUILBAUD

Cible biofilms

- micro-organismes : quelques millièmes de mm
- « vivant non visible »

Comment les récupérer ?

→ **Méthodes de prélèvements**
Valérie MICHEL

Les rendre visibles

- Appliquer méthodes appropriées
- Pour mettre en évidence différents types de micro-organismes



Comment les analyser ?
Méthodes d'analyses microbiologiques
Valérie HARDIT

Méthodes de prélèvements

Méthodes de prélèvements

Sources d'informations disponibles

- ✓ Guide sur les pratiques de prélèvement de surfaces en industrie agro-alimentaire

<https://www.actia-asso.eu/wp-content/uploads/RMT-Actia-Chlean>



- ✓ Prélèvements en fermes : (surface, machine à traire)
Fiches procédures de prélèvements

<https://www.rmtfromagesdeterroirs.com/realisations>

Onglets « microflores des laits et des fromages »



Méthodes de prélèvements

Prélever des micro-organismes sur une surface

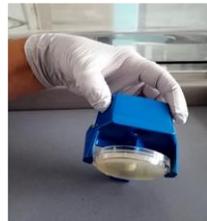
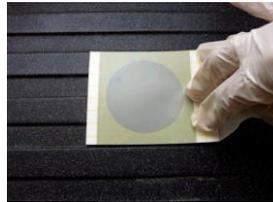
Récupération des micro-organismes
par contact



Ecouvillon
Lingette



Eponge



Géloses
contact

Guide sur les pratiques de prélèvement de surfaces
en industrie agro-alimentaire

Méthodes de prélèvements

Prélever des micro-organismes sur une surface

Récupération des micro-organismes par contact

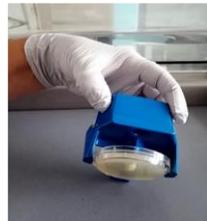
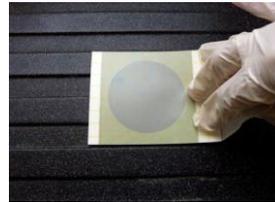
Récupération des micro-organismes passés en solution



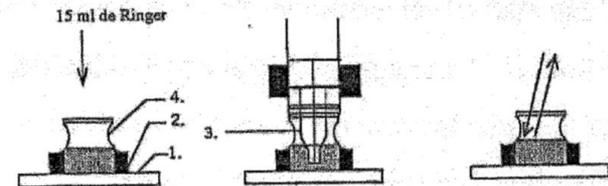
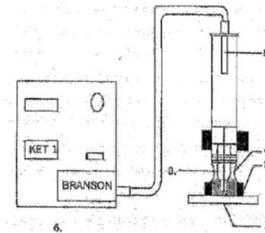
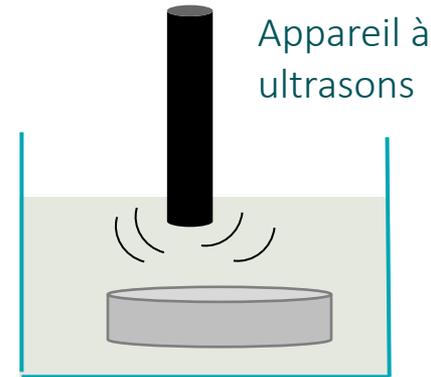
Ecouvillon
Lingette



Eponge



Géloses
contact



Guide sur les pratiques de prélèvement de surfaces en industrie agro-alimentaire

Méthodes de prélèvements

Prélever des micro-organismes sur une surface



Quelques points de vigilance

- Eviter les contaminations croisées
→ ne prélever que le support



- Figer le prélèvement

→ conservation au froid

→ envoi pour analyses en froid



Récupération des biofilms en surface de coupons acier inoxydable

→ Objectifs

- Disposer d'une méthode simple de prélèvements des biofilms en surface des coupons
- En évaluer l'efficacité de récupération
- Vérifier son impact sur la qualité des surfaces des coupons



Préalable méthodologique aux essais sur le pilote

Etude récupération du biofilm : méthodologie

- Biofilms étudiés : *Pseudomonas* et mélange *Pseudomonas* + Lactocoques
souches *Pseudomonas* : *Ps.fluorescens* 3.8 et *Ps.korensiis*
souches Lactocoques : *L.lactis* 33D et *L.lactis* 08A
- Surfaces à tester : coupons en acier inoxydable
- Méthodes de décrochage testées: Ecouvillon, spatule plastique
- Etablissement biofilm : après 72h, vérification niveaux cellules planctoniques et cellules adhérentes
- Méthodes de dénombrement : Gélose TSA (Tryptone Soy Agar) + géloses sélectives CFC (*Pseudomonas*) et M17 (Lactocoques) /30°C-48h

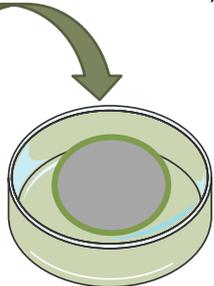


Tests effectués sur 6 coupons en parallèle (répétabilité) et en duplicat (reproductibilité, Série 1 / Série 2) pour chaque modalité

Analyse d'un coupon témoin après 24h (cellules adhérentes) et 48h (cellules planctoniques et adhérentes)

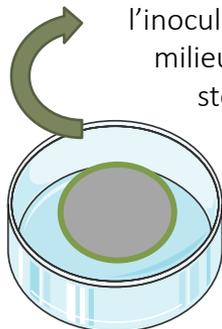
Etude récupération du biofilm : méthodologie

Ensemencement des coupons (jusqu'au recouvrement de la surface)



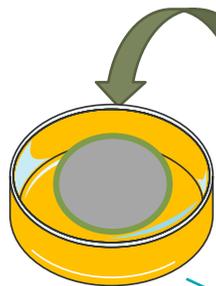
Préparation des souches microbiennes en milieu MMBB+ lait UHT 0,1% à une concentration de 10^6 UFC/mL

Contact coupons-souches microbiennes 18h-T° amb. (couvercle en place)



Retrait de l'inoculum (ou du milieu MMBB stérile)

Rinçage 2 fois à l'eau peptonnée tamponnée

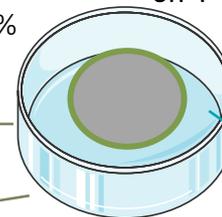
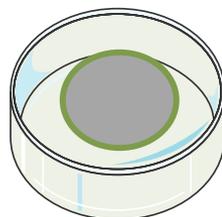


Prélèvement 1mL au 2^{ème} rinçage pour dénombrement cellules planctoniques

72h

Coupons « phase sèche » pendant 6h-T° amb.

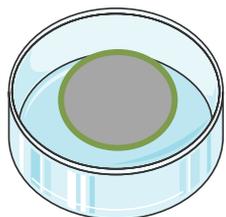
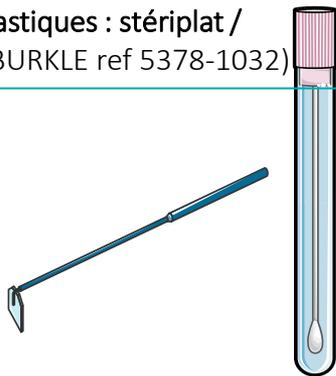
Renouvellement de milieu MMBB+0,1% lait UHT stérile 18h-T° amb.



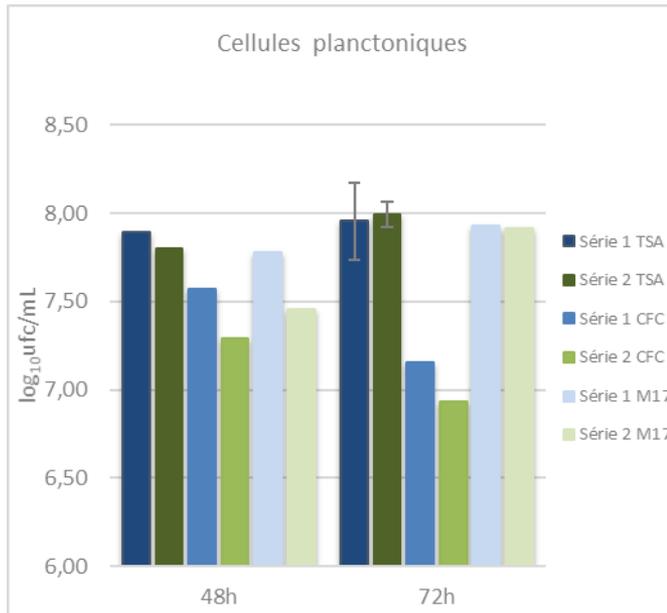
Prélèvement de cellules adhérentes sur coupons témoins

Après le cycle de 72h : Décochage des biofilms Ecouvillon-spatule et dénombrements

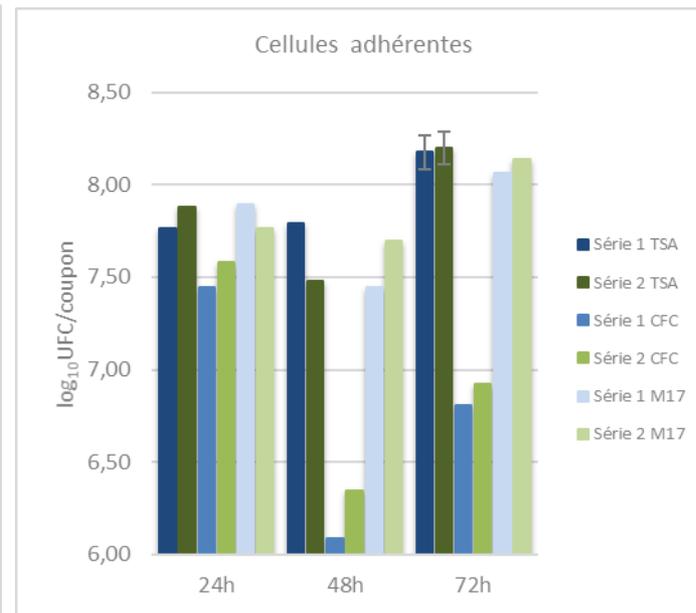
écouvillon stérile (COPAN -ref 155C)
spatules plastiques : stériplat / laboplast (BURKLE ref 5378-1032)



Implantation des biofilms en surface de coupons : résultats



Concentration de cellules planctoniques (log₁₀ UFC/mL) dénombrée dans l'EPT de rinçage des coupons Inox inoculés avec *Pseudomonas*+*Lactocoques*



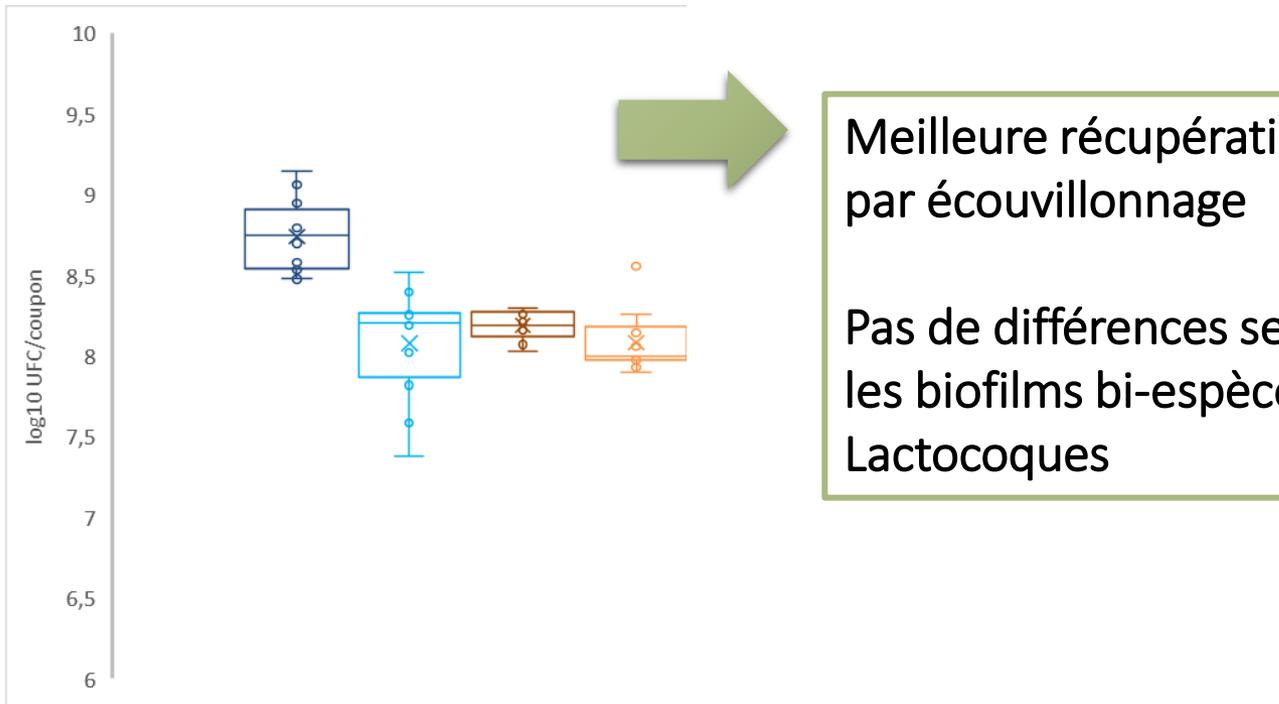
Concentration de cellules adhérentes (log₁₀ UFC/coupon) récupérées sur la totalité de la surface du coupon Inox inoculé avec *Pseudomonas*+*Lactocoques*

A 72h, niveau important de cellules planctoniques (proche de celui observé à 48h)

Cellules adhérentes prélevées via écouvillon :

Moyenne (TSA) = $8,19 \pm 0,016$ log₁₀ UFC/coupon

Récupération des biofilms en surface de coupons : résultats



Meilleure récupération des *Pseudomonas* par écouvillonnage

Pas de différences selon la méthode pour les biofilms bi-espèce *Pseudomonas* + Lactocoques

Boîtes à moustaches représentant l'ensemble des valeurs de concentrations microbiennes (\log_{10} UFC/coupon) récupérées et dénombrées après les 72h d'entretien des biofilms pour chaque modalité étudiée.

bleu foncé : *Pseudomonas*-écouvillon

bleu clair : *Pseudomonas*-spatule

marron : *Pseudomonas*+ *Lactocoques*-écouvillon

orange : *Pseudomonas* + *Lactocoques*-spatule

Conclusions générales sur les prélèvements en surface de coupons d'acier inoxydables

Méthodes de récupération : écouvillon vs spatule plastique

- ➔ Biofilms mono ou bi-espèces sont récupérables par des méthodes simples d'utilisation : l'écouvillonnage est le plus efficace pour le biofilm mono-espèce
- ➔ Simplicité d'utilisation et de conditionnement de l'écouvillon

Conclusions générales sur les prélèvements en surface de coupons d'acier inoxydables

Méthodes de récupération : écouvillon vs spatule plastique

- ➔ Biofilms mono ou bi-espèces sont récupérables par des méthodes simples d'utilisation : l'écouvillonnage est le plus efficace pour le biofilm mono-espèce
- ➔ Simplicité d'utilisation et de conditionnement de l'écouvillon

Impact sur les propriétés de surface

- ➔ La mouillabilité et la rugosité des échantillons après prélèvement est la même quelle que soit la méthode utilisée = pas d'effet du prélèvement sur cette propriété de surface
- ➔ L'augmentation de l'hydrophilie de surface pourrait être liée à un encrassement macro-moléculaire dû à la présence antérieure du biofilm, ce qui aura un impact sur l'implantation future des microorganismes sur les coupons
- ➔ Vérification dans le pilote que les procédures de nettoyage et désinfection permettent de restaurer l'état natif si besoin

Analyses microbiologiques

Source : diapositives du programme FlorAcQ

Analyses microbiologiques

Qui sont les microorganismes du lait ?

Les microorganismes sont des êtres vivants si petits qu'ils ne sont observables qu'au microscope

Ils peuvent être séparés en 3 types : bactéries, levures et moisissures, les premières étant les plus nombreuses dans le lait.

Richesse microbienne du lait cru 300 espèces bactériennes et 74 espèces de levures

Pour chaque type de microorganismes, les microbiologistes différencient des genres microbiens (ex *Lactobacillus*, *Saccharomyces*), qui eux-mêmes réunissent différentes espèces (ex *Lactobacillus bulgaricus*, *Saccharomyces cerevisiae*), qui elles-mêmes présentent plusieurs souches.



300 espèces bactériennes
74 espèces de levure

Microbiote des laits :
divers qualitativement et
quantitativement

Méconnaissance
diversité souches



Classification des microorganismes en fonction de leurs intérêts/risques vis-à-vis de l'élaboration et de la qualité des produits



utile ou d'intérêt



- Bactéries lactiques
- Bactéries d'affinage
- Certaines levures et moisissures

altération ou indésirable



- Certaines bactéries Gram – (*Pseudomonas*, coliforme)
- Butyriques
- Quelques moisissures...



potentiellement pathogène



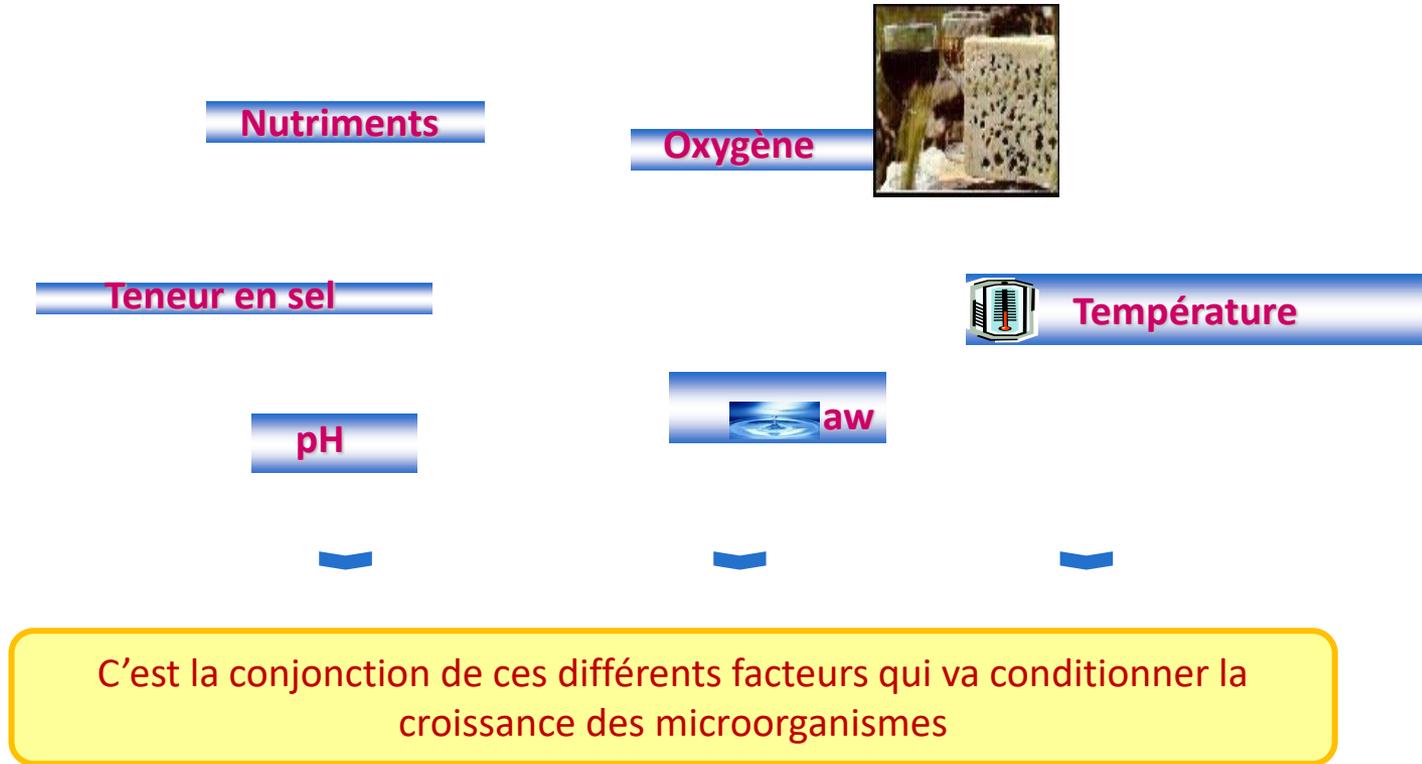
- *S. aureus*
- *L. monocytogenes*
- *E. coli*
- *Salmonella*



« Germes » totaux

Un même microorganisme peut être classé « indésirable » dans une technologie et « utile » dans une autre. (Ex: *Mucor* est utile en tomme de Savoie et indésirable en camembert)

Quels facteurs influencent leur développement?



Comment identifier les microorganismes?



Etallement sur différents milieux



Après incubation



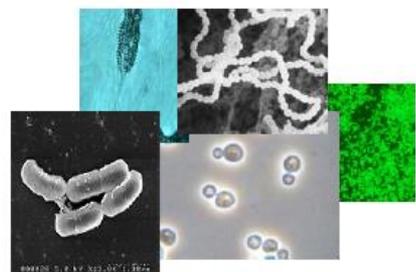
Sur les boîtes de Petri les microbes forment des colonies différentes d'aspect, de couleur

= BIODIVERSITE morphologique

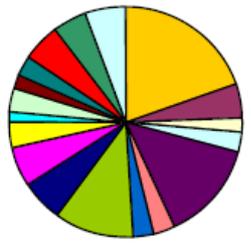
Isoler les colonies

Comment identifier les microorganismes (2)?

1. Etude de leur morphologie



Au microscope, ils ont des morphologies différentes



BIODIVERSITE Lait et fromage

74 espèces de levure
300 espèces bactériennes

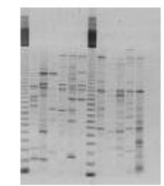
2. Etude des exigences nutritives



Pour se multiplier, ils n'ont pas tous besoin de la même température, d'air, des mêmes nutriments (sel, sucre, protéines...)

3. Etude de l'ADN

ATTGGGCAA



Séquençage ADN Typage

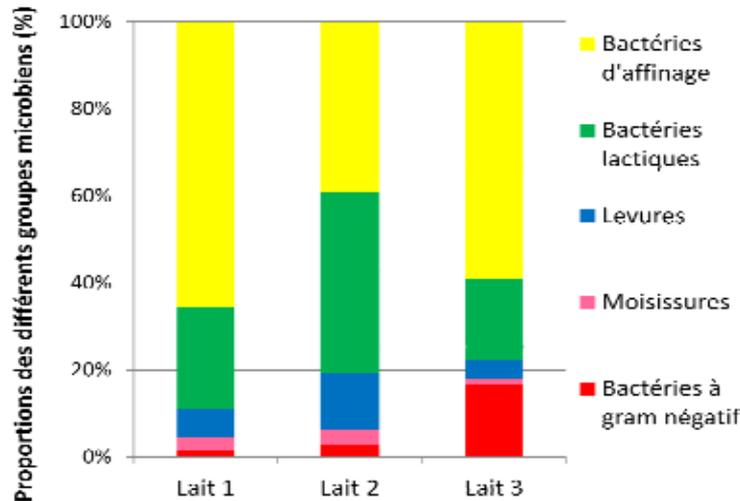
BIODIVERSITE Intra espèce

Classification en

- Genre : *Lactobacillus*
- |
- Espèce : *Lactobacillus casei*
- |
- Souche : *Lactobacillus casei* URF 545

Exemples d'équilibres microbiens du lait

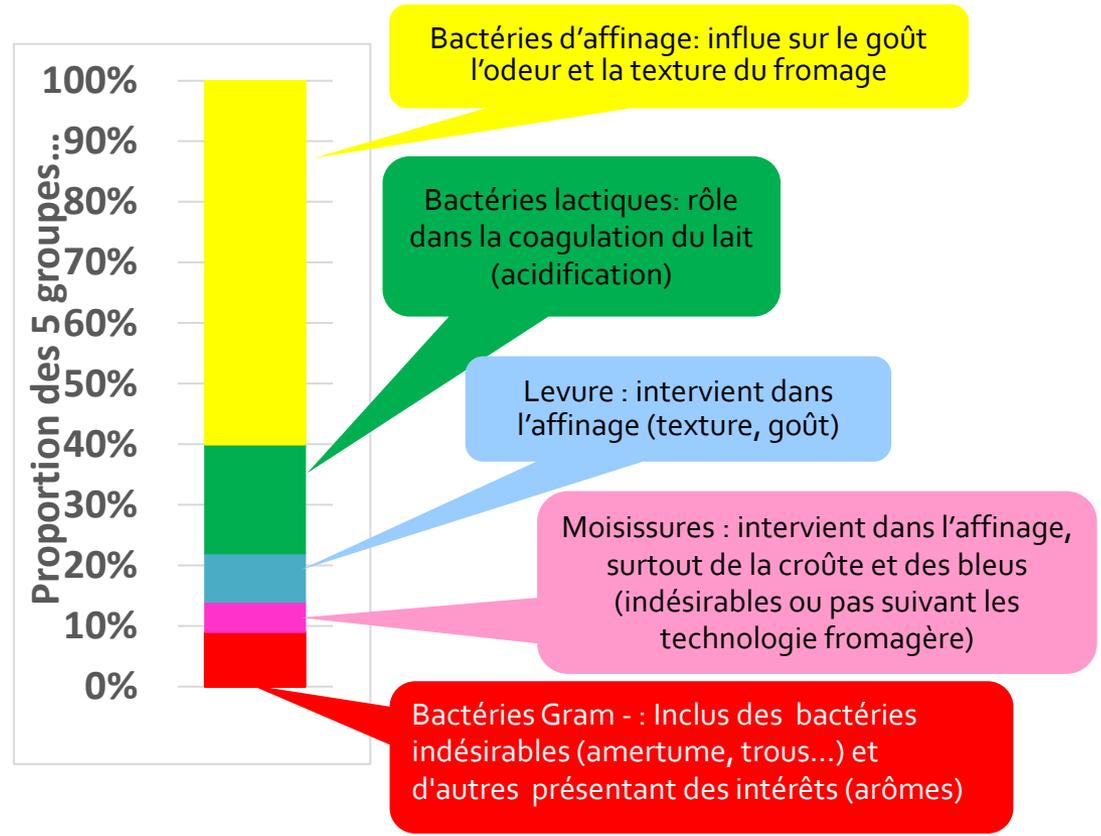
Indices relatifs des principaux groupes microbiens dans les laits crus d'un producteur



CODE COULEUR

- Bactéries d'affinage :**
 - Actinobactéries :
ex : *Corynebacterium*, *Brevibacterium*...
 - *Staphylococcaceae* :
ex : *Staphylococcus*, *Micrococcus*
- Bactéries lactiques :**
Ex : *Lactobacillus*, *Leuconostocs*, *Enterococcus*, *Pediococcus*
- Levures :**
Ex : *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*...
- Moisissures :**
Ex : *Penicillium*, ...
- Bactéries à Gram négatif :**
Pseudomonas, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Acinetobacter* ...

Exemples d'équilibres microbiens du lait



Lait cru = écosystème complexe

Ce n'est pas la charge globale en microorganismes d'un lait qui influence la qualité fromagère finale.



La nature des microorganismes (diversité) et l'interaction entre les microorganismes du lait et leur dynamique tout au long de l'affinage contribuent :

- à la richesse aromatique des fromages au lait cru
- effet inhibiteur vis à vis des pathogènes



Le regroupement des microorganismes en « bons » ou « mauvais » est à nuancer en fonction:

- des technologies considérées
- d'un excès de microorganismes ou d'un déficit



Importance des équilibres microbiens

A retenir

- Analyses à réaliser en fonction de la question posée : résolution d'un problème sanitaire ? (on peut alors regarder que les pathogènes), d'un problème technologique liée à la microflore du lait (regarder alors microflores d'altération spécifiques), ...etc
- En particulier **Démarche FlorAcQ** : Gérer un équilibre microbien des laits en faveur de la qualité fromagère tout en assurant la qualité sanitaire (des analyses pathogènes ont été réalisées en plus des milieux Floracq)

Atelier de physico-chimie des surfaces

Morgan Guilbaud
Ingénieure de Recherche
AgroParisTech, Massy

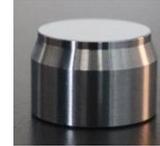
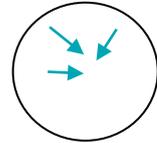
Nadia Oulahal
Maitre de conférences
BioDyMia, Université Lyon 1

Définitions des valeurs de rugosité de surface d'un matériau

La rugosité est mesurée dans 3 axes différents

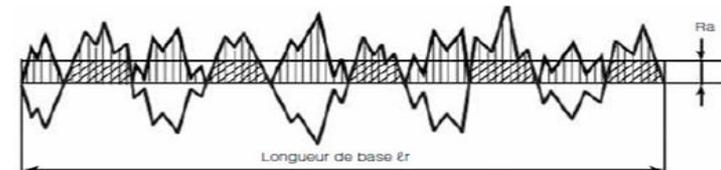
- Paramètres (μm)

- **Ra: rugosité moyenne arithmétique**
(écarts moyen par rapport à une ligne de référence)
- Rz: moyenne des hauteurs maximales
- Rmax: rugosité la plus importante



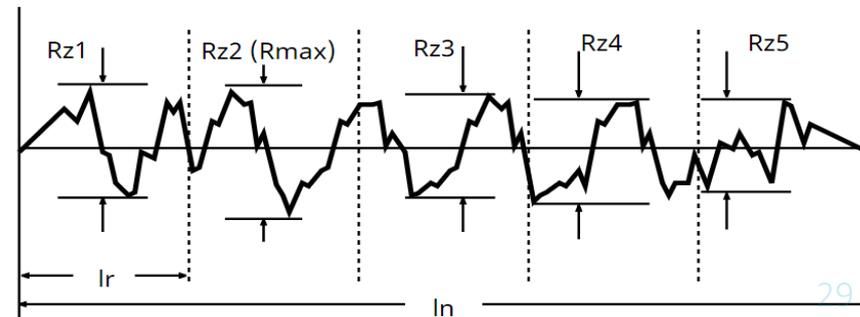
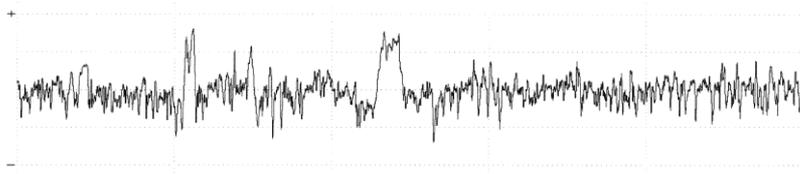
Profilomètre: SJ210, MITUTOYO

$$Ra, Pa, Wa = \frac{1}{\ell_r} \int_0^{\ell_r} |Z(x)| dx$$

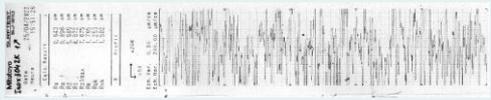
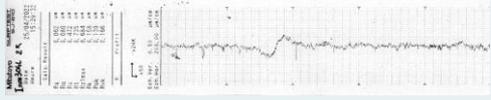
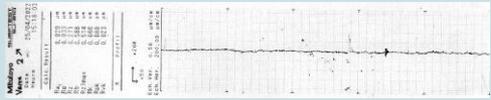


Rugosité Ra: en mécanique, une moyenne caractérisant l'état de surface d'une pièce ou d'un matériau

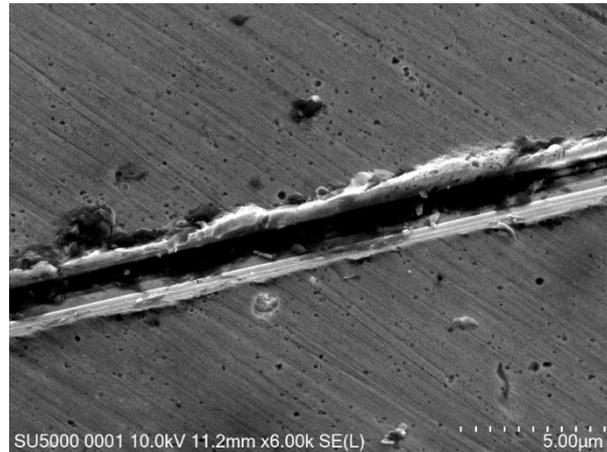
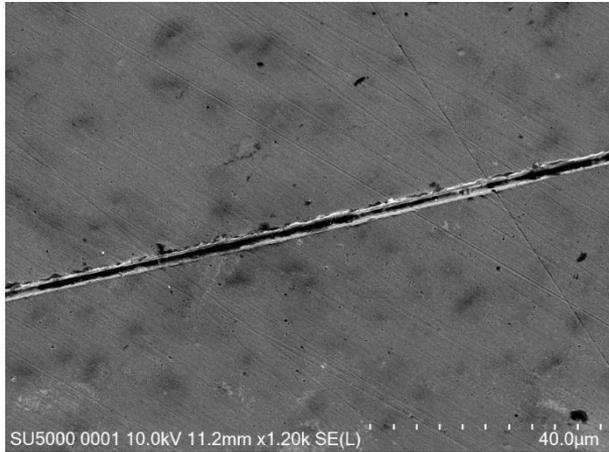
- Profil de rugosité



Classement de la rugosité de surface des matériaux proposés

Photo	Numéro	Matériau	Rugosité (Ra en μm)	Profil type
	4	Polyuréthane	4,46	
	1	Acier inoxydable 304 2K	0,64	
	2	Intérieur d'un tuyau long à lait	0,17	
	5	Acier inoxydable 304 L	0,05	
	3	Verre	0,02	

Une micro-rayure sur une surface...



... peut « héberger et protéger des habitants »



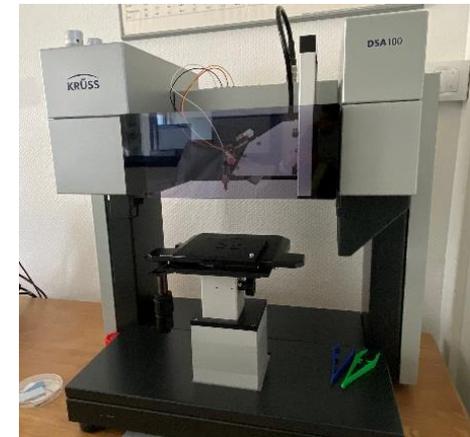
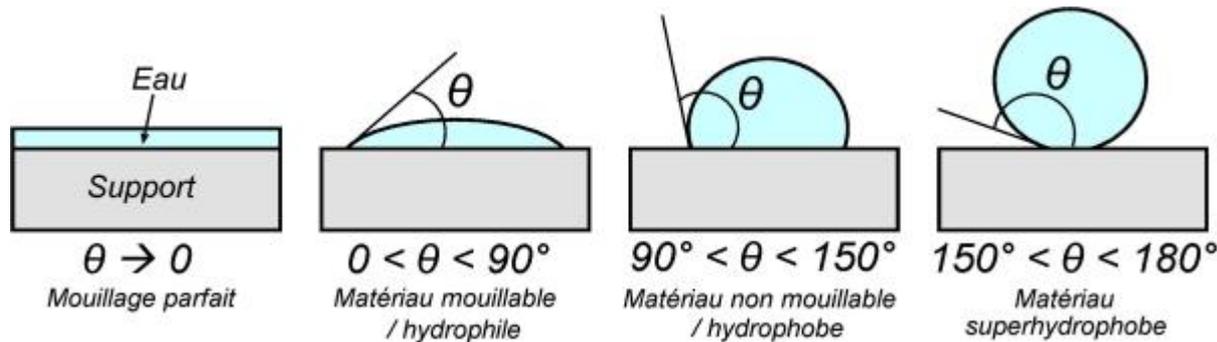
Attention à l'état du matériel qui en se dégradant ne permet plus un nettoyage efficace

Définition de la mouillabilité

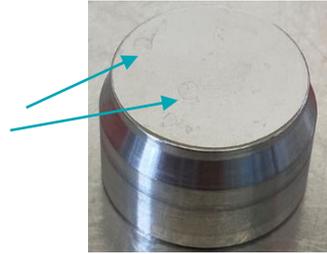
➔ Aptitude d'une surface à être mouillée par une matière donnée

permet de prédire le comportement de la surface dans de nombreuses situations appliquées

Quantification de l'affinité entre un liquide et une surface par dépôt de gouttes et mesure de leur angle de contact (liquide, solide, air)



Révélation d'un encrassement de substances? (protéines, lipides, sucres, sels...)



Une modification de mouillabilité peut révéler un encrassement de substances



L'encrassement peut modifier le comportement de l'eau sur la surface + constituer un réservoir nutritionnel



Le nettoyage et la désinfection pourront être impactés

Risque de développement de biofilms car

- Création d'une microrugosité
- Réservoir nutritionnel



- ➔ Les coupons amovibles du pilote permettent d'analyser l'intérieur de la machine à traire et notamment l'état des surfaces

- ➔ Attention à la modification des surfaces des matériaux
 - ➔ formation de "niches/cachettes" à bactéries qui vont pouvoir par la suite se multiplier, se décrocher et passer dans le lait, ce qui peut être dangereux si elles sont pathogènes

Conclusion de l'atelier

ce qu'il ne faut pas oublier

Prélèvements et analyses des biofilms

- ➔ Essais comparatifs nécessaires pour valider méthodes de prélèvements
- ➔ Possibilité de méthodes simples (ex écouvillons)
- ➔ Précautions dans les prélèvements (contamination croisée, conservation au froid (+4°C))

Propriétés physico-chimiques des surfaces

- ➔ Les coupons amovibles du pilote permettent d'analyser l'intérieur de la machine à traire et notamment l'état des surfaces
- ➔ attention à la modification des surfaces des matériaux
 - ➔ formation de "niches/cachettes" à bactéries qui vont pouvoir par la suite se multiplier, se décrocher et passer dans le lait, ce qui peut être dangereux si elles sont pathogènes ou provoquer des altérations du produit fini pour d'autres flores

Analyses microbiologiques

- ➔ Analyses à réaliser en fonction de la question posée : résolution d'un problème
 - sanitaire ? (on peut alors regarder que les pathogènes)
 - technologique lié à la microflore du lait (regarder alors microflores d'altération spécifiques),

- ➔ Existence de démarches globales, en particulier **Démarche FlorAcQ** :
« *Gérer un équilibre microbien des laits en faveur de la qualité fromagère tout en assurant la qualité sanitaire* »
(des analyses pathogènes peuvent être réalisées en plus des milieux Floracq)

