

Master Nutrition, Sciences des Aliments, Qualité et Sécurité Alimentaires
Spécialité Qualité et Sécurité Alimentaires

DIABY Kadi

Les biofilms en industrie agroalimentaire : optimisation de leur élimination

Mémoire de fin d'études de la 2ème année de Master
Année universitaire 2017-2018

Sous la direction de Madame Justine SMAL-TAHA

Date de soutenance : Mercredi 17 octobre 2018

Membres du jury :

Président de jury : Madame Annabelle DERAM

2ème membre de jury : Madame Caroline LANIER

3ème membre de jury : Madame Martine LAMARENIE

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS (TABLEAUX ET FIGURES)	6
INTRODUCTION	7
PARTIE 1 : DEFINITION DES BIOFILMS	8
1. Définition	8
2. Historique	9
3. Diversité des biofilms	10
3.1. Nature des biofilms	11
3.2. Structure des biofilms.....	13
3.2.1. Les constituants d'un biofilm	13
3.2.2. L'organisation stratifiée	14
4. Formation d'un biofilm	15
4.1. Formation d'un film conditionnant	16
4.2. Le transport des micro-organismes et adhérence	17
4.3. Adhésion	18
4.3.1. Adhésion réversible.....	18
4.3.2. Adhésion irréversible	19
4.4. Croissance et maturation du biofilm	20
4.5. Dispersion du biofilm.....	21
5. Conditions de développement d'un biofilm.....	22
6. Avantage du mode de vie en biofilm	23
PARTIE 2 : LES BIOFILMS DANS L'INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE	24
1. Introduction	24
2.1. Un nettoyage parfait.....	25
2.1.1. L'action chimique	25
2.1.2. L'action mécanique	25
2.1.3. La température	26
2.1.4. Le temps de contact	26
2.2. Les agents de nettoyage.....	26
2.2.1. Les agents de nettoyage alcalins	26
2.2.2. Les agents de nettoyage acides	27
2.2.3. Les détergents enzymatiques.....	28
2.3. La désinfection	28

2.3.1. Halogènes et dérivés	29
2.3.2. Aldéhydes.....	29
2.3.3. Les alcools	29
2.3.4. Oxydants.....	30
2.3.5. Les dérivés phénoliques	30
2.3.6. Les ammoniums quaternaires	31
2.3.7. Les biguanides	31
PARTIE 3 : CHOIX DES PRODUITS POUR LUTTER CONTRE LES BIOFILMS....	32
1. Introduction	32
2. Choix du produit de nettoyage	32
3. Choix du produit désinfectants	33
3.1. Choix en fonction des produits manipulés et micro-organismes	34
3.2. Action des désinfectants	38
3.3. Avantages et inconvénients des désinfectants	39
4. Nature de la surface.....	46
5. La « meilleure méthode » de lutte contre le biofilm	47
CONCLUSION.....	49
BIBLIOGRAPHIE.....	50

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Mme SMAL-TAHA, ma directrice de mémoire, pour son aide lors de la construction de la problématique, ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils durant la période de rédaction du mémoire.

Ensuite, je remercie Mme LANIER pour l'accueil au sein du Master 2 et pour ses conseils et informations données concernant le déroulement de l'année.

Je remercie également tous les enseignants et intervenants du master qui m'ont fait découvrir et approfondir des notions du domaine de la qualité en agro-alimentaire.

Pour finir, je remercie les membres de mon jury.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : acide ribonucléique

EPS : Extracellular polymeric substances

Gram - : Gram négatif

Gram + : Gram positif

IAA : Industrie Agro-Alimentaire

INSEE : Institut national de la statistique et des études économiques

MAAF : Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt

NAF : Nomenclature d'Activités Française

NEP : Nettoyage en place

TIAC : Toxi Infection Alimentaire Collective

TABLE DES ILLUSTRATIONS (TABLEAUX ET FIGURES)

Figure 1 : Biofilm sur un grain de sable. (Source Google image)	8
Figure 2 : Schéma de la formation d'un biofilm (Douarche C. et al. (2018))	16
Tableau 1: Facteurs influencent la formation d'un biofilm	23
Tableau 2: Choix du produit nettoyant en fonction des souillures.....	33
Tableau 3 : Secteurs d'activité en IAA (INSEE)	34
Tableau 4 : Micro-organismes et virus identifiés et aliments associés (Bourgeois et. al., 1996 ; Haeghebaert et al., 2002 (cité par ZULIANI et GARRY,2004), fiche ANSES)	37
Tableau 5 : Spectre d'activité des désinfectants (CAPP-INFO 2007, CRITT Agroalimentaire PACA 2015, INRS, Christine David et Isabelle Balty 2014).....	39
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des désinfectants (Jean-Claude Belloin 1993, Nassima-Didouh 2015, J M 2011, Massicotte 2009)	45
Tableau 7 : Nettoyage/Désinfection : Risques en fonction de la nature des surfaces (Le point sur le nettoyage », INTERBEV, juillet 1998 cité par CRITT Agroalimentaire PACA 2015).....	47

INTRODUCTION

Un biofilm est un amas structuré de micro-organismes (bactéries, champignons, algues) enrobés d'une matrice polymérique et attaché à une surface. Il présente une structure très organisée. En effet, les micro-organismes d'un biofilm vont acquérir certains caractères qui leur permettent de s'adapter à ce mode de vie et aux micro-organismes qui les entourent. Le biofilm est recouvert d'une matrice extracellulaire, elle va servir de protection contre les facteurs environnementaux. Sa destruction sera donc difficile.

Dans l'industrie agro-alimentaire (IAA), on trouve différents micro-organismes selon les aliments manipulés et/ou transformés. Ces derniers ont la capacité à former un biofilm s'ils ne sont pas éliminés. Or, la présence de biofilm en IAA est problématique. Une contamination des aliments distribués engendrera une perte économique et également un risque pour la santé du consommateur.

A travers ce mémoire, nous chercherons à savoir comment optimiser l'élimination des biofilms dans le domaine alimentaire.

La dégradation des biofilms étant difficile, il faut agir en amont afin d'éviter leur formation. La première condition pour éviter la formation de biofilms est de maintenir une bonne hygiène sur les lieux de production. Nous allons donc identifier les différents produits de nettoyage et de désinfection, ensuite voir comment choisir les produits adaptés aux secteurs des IAA. Enfin, rechercher s'il y a une « meilleure méthode » de lutte contre les biofilms.

PARTIE 1 : DEFINITION DES BIOFILMS

1. Définition

Un biofilm est une couche de micro-organismes constituée de différentes espèces (bactéries, algues, champignons et/ou protozoaires), dans lequel des cellules s'associent et adhèrent à une surface pour s'y développer. Ils établissent une forte relation d'adhérence entre eux par la synthèse de substances polymères qui forment une matrice qui englobe leurs cellules (Costerton, 1978). Au sein du biofilm, les microorganismes présentent des caractéristiques particulières : leur organisation interne, leur métabolisme, la communication chimique que les cellules échangent entre elles... (Tolker- Nielsen, 2000). Un biofilm peut se développer sur différentes surfaces naturelles ou artificielles ; dans les eaux, dans les sols, sur les végétaux (racines ou feuilles), sur les animaux (épidermes, plaque dentaire, muqueuse intestinale...). Ils peuvent être présents sur n'importe quel tissu en contact avec une atmosphère non stérile et ce dans des milieux naturels, industriels ou hospitaliers. La figure 1 nous montre un biofilm sur un grain de sable, observé en microscopie.

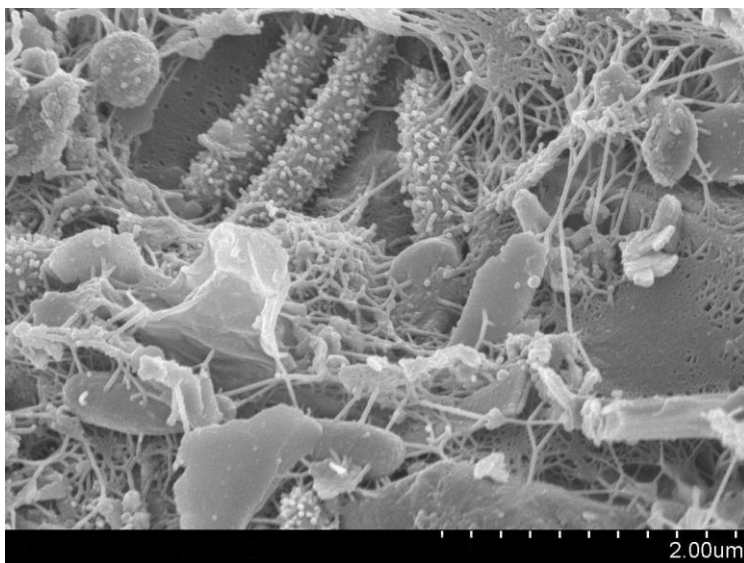


Figure 1 : Biofilm sur un grain de sable. (Source Google image)

Les biofilms sont présents sur la plupart des objets que nous utilisons, mais aussi sur les aliments. Ils sont responsables de la « bio salissure » : Biofouling en anglais, c'est la formation d'une couche gênante d'êtres vivants sur une surface artificielle en contact permanent ou fréquent avec de l'eau (par exemple : les équipements industriels en agroalimentaire, les coques des navires, les canalisations pour les

eaux potables... Ils sont également impliqués dans les risques de maladies nosocomiales quand ils colonisent les plaies ou implants (prothèses, respirateurs...).

2. Historique

Les biofilms sont observés depuis longtemps, leurs caractéristiques et leurs structures n'étaient pas encore connues. Durant les années 1600, Antoni Van Leeuwenhoek, commerçant et scientifique néerlandais, a été le premier à observer et décrire les micro-organismes (à l'origine appelés « animalcules ») à l'aide d'un microscope fabriqué à la main. Il a utilisé un échantillon issu de sa surface dentaire (Donlan, 2002).

Les méthodes d'observation des biofilms étant peu performantes, leur mise en évidence a été difficile. C'est en 1933, en effectuant des expériences sur la croissance des algues placées sur une lame de verre et plongées dans un aquarium qu'Arthur Henrici va observer l'existence des biofilms. Il s'aperçoit que les micro-organismes, en milieux aqueux, vivent en communauté organisées, fixées sur un support, entourées d'une matrice et non sous forme planctonique (cellules isolées, flottantes dans un milieu liquide) (Henrici, 1933). Bien que le terme « biofilm » ne soit pas encore utilisé, le concept est né.

Deux ans après les études d'Henrici, Claude Ephraim Zobell qui a été le pionnier de la recherche sur les micro-organismes et les processus microbiens dans l'océan (précurseur dans le domaine de la microbiologie marine), a poursuivi les études sur les biofilms. Il a également observé le comportement des micro-organismes (bactéries) dans un milieu aquatique : les phénomènes de la fixation réversible/irréversible ainsi que la formation de micro-colonies qui sont les premières étapes de la formation d'un biofilm (Zobell et Allen 1935).

En 1969, les études de Jones et al. utilisant la microscopie électronique à balayage et de transmission pour examiner les biofilms sur les filtres dans une station de traitement des eaux usées ont montré qu'ils étaient composés d'une variété d'organismes (grâce à l'observation de la morphologie cellulaire).

C'est à partir des années 1970, par l'apparition de nouvelles techniques, que l'étude des biofilms a pris véritablement son essor. Les techniques utilisées étaient

principalement la microscopie électronique à balayage et les cultures microbiologiques. En utilisant un colorant spécifique de polysaccharide (le rouge de Ruthénium) couplé à un fixateur (le tétr oxyde d'osmium), les chercheurs ont été en mesure de montrer que la matrice entourant et enfermant des cellules dans ces biofilms était un polysaccharide.

Dès 1973, Characklis par l'étude des boues microbiennes dans les systèmes industriels d'eau a montré que les biofilms étaient aussi très résistantes aux désinfectants comme le chlore (Characklis, 1973). Quelques années plus tard, par l'observation de la plaque dentaire et des communautés sessiles dans les cours d'eau de montagne, Costerton et son équipe ont présenté la théorie sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes sur les matériaux vivants et non vivants. Le terme de « biofilms » est proposé pour la première fois, en supposant que ce serait le mode de vie naturel adopté par de nombreux micro-organismes (Costerton, 1978).

Aujourd'hui, de nombreuses études sur les biofilms ont été réalisées, que ce soit dans le domaine médical, industriel ou dans le milieu naturel.

3. Diversité des biofilms

Dans la nature, les bactéries existent sous deux formes : la forme planctonique (les bactéries sont libres et flottent dans leur environnement) et sous forme de biofilm (Costerton, 1978). Elles peuvent passer d'une forme à l'autre. Lorsqu'elles sont sous forme planctonique, les bactéries prolifèrent et colonisent les milieux où elles sont présentes. Cette forme est minoritaire. Le mode de vie dominant des bactéries dans l'environnement est sous forme de biofilm. Les bactéries sous forme libre (sous forme planctonique) vont s'attacher sur une surface de façon irréversible et vont croître. Durant cette croissance, elles vont produire des polymères extracellulaires qui vont s'accumuler et former une matrice extracellulaire à forte teneur en eau. Les bactéries vont être immobilisées dans cette matrice, leur proximité va permettre de réaliser des échanges de nutriments et de signaux.

Le mode de vie en biofilm permet à une colonie bactérienne de vivre en ayant une protection contre un certain nombre de stress environnementaux (par exemple

l'action d'agents antimicrobiens/antibactériens), ainsi, elle peut persister dans un milieu sans même proliférer.

Les biofilms présentent une grande diversité au niveau structurale, ils peuvent être composés d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes, l'épaisseur de la couche de micro-organismes est variable (une couche ou plusieurs couches de micro-organismes) ; l'organisation va être différente d'un biofilm à l'autre.

3.1. Nature des biofilms

Les biofilms sont hétérogènes aussi bien dans les temps que dans l'espace. (Tolker-Nielsen, 2000). On distingue les biofilms homogènes des biofilms hétérogènes. Un biofilm homogène est constitué d'une seule espèce de micro-organismes. Quant au biofilm hétérogène, il est composé des plusieurs espèces. La présence d'une espèce de micro-organisme dans le biofilm va dépendre des conditions environnementales dans lesquelles il est. Les biofilms présents dans un environnement éclairé par de la lumière (lumière du soleil par exemple) seront constitués d'organismes majoritairement phototrophes, ils vont mettre à profit l'énergie lumineuse pour réaliser la synthèse de leurs aliments (algues unicellulaires, cyanobactéries...). Quant aux biofilms présents dans un environnement dépourvu de lumière, les micro-organismes seront principalement hétérotrophes (micro-organismes qui vont dégrader la matière organique) et chimiotrophes (oxydation de substances minérales) (Wanner, 2006).

Une diversité est aussi observée au niveau des supports colonisés, en effet les biofilms peuvent se développer sur des surfaces inertes ou vivantes. Ils peuvent se développer sur des surfaces minérales (roches, interfaces liquides/air), des surfaces organiques (peau, tractus intestinal, rhizosphère des plantes), des surfaces industrielles (canalisation, la coque des navires), ou sur des surfaces médicales (pacemaker, sonde, cathéter). Les propriétés physico-chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm.

L'organisation structurale d'un biofilm va être différente selon le type de support sur lequel il se forme (Donlan, 2002). Par exemple, un biofilm qui se forme dans une canalisation aura une structure complexe car il va contenir des composants divers (boue, produit provenant de la réaction de corrosion...). Contrairement à ce type de

biofilm, un biofilm formé sur une surface médicale l'organisation sera plus simple (Donlan, 2002).

Une surface solide peut avoir plusieurs caractéristiques importantes impliquées dans le processus de fixation. Les études de Characklis et al. (1990) ont montré que l'étendue de la colonisation microbienne semble augmenter lorsque que la rugosité de surface augmente. Cela est dû au fait que les forces de cisaillement sont diminuées, et la surface est plus élevée sur les surfaces plus rugueuses. Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent également exercer une forte influence sur le taux et l'étendue de la fixation. La plupart des chercheurs ont trouvé que les micro-organismes se fixent plus rapidement à des surfaces hydrophobes et non polaires tels que le téflon et d'autres matières plastiques que des matériaux hydrophiles tels que le verre ou les métaux (Fletcher M, Loeb GI, 1979 ; Pringle JH, Fletcher M, 1983 ; Bendinger et al., 1993). Les résultats de ces études sont parfois contradictoires car il n'existe pas de méthode standardisée pour déterminer l'hydrophobicité de la surface.

Les biofilms n'ont pas tous la même épaisseur. En effet un biofilm qui vient de se former aura moins de couche de micro-organismes (souvent monocouche) contrairement à un biofilm plus ancien qui aura beaucoup plus de couches. (Bury-Moné, 2007). Selon les conditions nutritives, un biofilm aura une architecture plus ou moins complexe. La formation d'un biofilm nécessite un bon apport en nutriments, d'autant plus qu'ils sont constamment remodelés. Mais, l'étape de développement tardif est possible dans des conditions nutritives moins bonnes.

Les organismes composant le biofilm peuvent également avoir un effet marqué sur la structure du biofilm. Par exemple, l'épaisseur du biofilm pourrait être affectée par le nombre d'organismes constitutifs. Des cultures pures de biofilms de *K. pneumoniae* ou *P. aeruginosa* dans un réacteur de laboratoire étaient fines (15 µm et 30 µm, respectivement), alors qu'un biofilm contenant les deux espèces était plus épais (40 µm). Cela pourrait être dû au fait qu'une espèce a amélioré la stabilité de l'autre (James et al., 1995).

3.2. Structure des biofilms

D'un point de vue structural les biofilms sont hétérogène ; ils peuvent se développer sur des surfaces différentes, ils peuvent avoir des épaisseurs variées et, ils sont constitués de micro-organismes divers (c'est un mélange d'espèces et des genres de micro-organismes). Malgré ces différences, on peut tout de même observer quelques similitudes structurales entre les biofilms. Ils ont une base commune composée d'une couche de cellules fixée sur un support, ensuite des couches de cellules englobées dans une matrice polysaccharidique avec des canaux aqueux.

3.2.1. Les constituants d'un biofilm

Un biofilm est constitué de micro-organismes agglomérés entourés de la matrice qu'ils synthétisent. La matrice inclut tous les éléments du biofilm. L'un des composant principale est l'eau (la quantité d'eau dans un biofilm peut aller jusqu'à 97%) d'où la propriété hydrophile de la plupart des biofilms (certains biofilms peuvent être hydrophobes). Un biofilm est aussi composé de polysaccharides sécrétés par les micro-organismes, de produits de dégradation et de substances issus du milieu extérieur. Il y a également de l'ADN, ARN et des lipides. Des canaux et pores sont aussi présents pour permettre le flux d'eau, d'oxygène, de nutriments, et d'ions... Ils auront également un rôle dans l'élimination des déchets (Clutterbuck AL, Woods EJ, et al., 2007)

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel. Quant à la matrice extracellulaire, elle représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée d'un biofilm. La matrice d'exopolysaccharides a un rôle structurale important, sa présence présente des avantages comme par exemple la protection des micro-organismes contre les facteurs environnementaux, de plus il confère une résistance contre les agents de dégradation des micro-organismes par exemple (Flemming H-C, 2001), (Sutherland, 2001). En se liant aux agents anti-microbiens, la matrice les empêche de pénétrer dans le biofilm. Ainsi, elle joue aussi un rôle dans les propriétés d'antibioresistance (Donlan, 2002).

La matrice est créée grâce à la production de substances polymériques extracellulaires (EPS, Extracellular polymeric substances) par les micro-organismes.

Les organismes produisent des quantités différentes d'EPS et cette quantité augmente avec l'âge du biofilm. Les EPS peuvent s'associer à des ions métalliques, des cations divalents, et à d'autres macromolécules (telles que des protéines, des ADN, des lipides...) (Flemming H-C, 2001). La production d'EPS est connue pour être affectée par l'état nutritif du milieu dans lequel il croît. Un excès en carbone disponible et une quantité faible en azote, en potassium ou en phosphate favorisent la synthèse des EPS. Une croissance bactérienne lente augmentera également la production des EPS (Sutherland, 2001).

D'un biofilm à l'autre, les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolysaccharides sont variables. La matrice ayant une forte capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogènes peut lutter contre la dessiccation dans certains milieux naturels. La couche la plus externe de la matrice se déshydrate parfois dans le but de former une interface sèche et ainsi d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001).

Au sein d'un biofilm, la matrice d'exopolysaccharides joue un rôle très important. En effet, elle a un rôle structural (maintien des micro-organismes en communauté) mais aussi un rôle de protection (barrière de protection contre certaines substances, protection contre la dessiccation...) (Donlan, 2002).

3.2.2. L'organisation stratifiée

Un biofilm a une organisation spatiale stratifiée, permettant des échanges (informations, nutriments...) et une coopération entre micro-organismes (Stoodley, 1997 ; Tolker-Nielsen, 2000).

Les cellules fixées en premier vont constituer la couche la plus profonde du biofilm. Ce sont des petites cellules à croissance lente et elles ont un métabolisme anaérobie (elles n'ont pas besoin d'oxygène pour vivre). La couche la plus externe, la couche superficielle est constituée de grandes cellules à croissance rapide qui ont un métabolisme aérobie (elles ont besoin d'oxygène pour vivre). Les cellules présentes entre ces deux couches sont micro-aérophiles (leur croissance est optimale dans un milieu où la concentration en oxygène est inférieure à la concentration atmosphérique).

Le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physico-chimiques. En laboratoire, les cultures sont réalisées en milieux liquides agités, ce qui permet d'avoir une concentration en oxygène ou en nutriments homogène. Par contre, le biofilm n'est pas un environnement homogène. Il présente des zones avec des concentrations variables en oxygène, nutriments et même des valeurs de pH différentes. Les cellules au centre des agrégats bactériens sont anaérobies, elles sont également pauvres en nutriments, tandis que celles situées près des canaux ou aux extrémités du biofilm sont aérobies et riches en nutriments. Les nutriments du milieu extérieur diffusent en grande quantité dans les couches les plus externes du biofilm (couches superficielles). Plus on avance en profondeur dans le biofilm, plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses, la diffusion est moins efficace. La présence de zones de croissance différente de micro-organismes s'explique par ces gradients (Costerton et *al.*, 1994).

4. Formation d'un biofilm

Le mécanisme de formation d'un biofilm passe par plusieurs étapes, les chercheurs en ont identifié cinq (Figure 1). Les micro-organismes sont présents dans un milieu liquide, ils se déplacent grâce à la force du flux, à la gravitation et aux mouvements de leurs flagelles. En s'approchant d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent, elles vont conduire à une interaction réversible entre l'organisme et la surface. Les micro-organismes vont se lier par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals, c'est l'étape d'adhérence (adsorption). Ensuite, ils vont se diviser, leur nombre va donc augmenter et l'adhésion va devenir irréversible et spécifique. Des molécules d'adhésion vont être impliquées (synthèse de structure à la surface des micro-organismes et modification du profil d'expression des gènes). Les micro-organismes vont poursuivre leur développement et former des amas cellulaires à la surface et, ils vont produire des polysaccharides extracellulaires. On parle alors de l'étape d'adhésion.

Après cette étape d'adhésion, c'est la phase de croissance : les amas cellulaires vont former des micro-colonies qui seront composées de micro-organismes qui se

divisent, mais aussi de micro-organismes qui vont s'attacher sur le biofilm en formation.

Puis vient l'étape de maturation qui consiste au développement des micro-colonies et à leur structuration. Elles vont se développer en piliers d'épaisseur variable et vont être englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces qui séparent des micro-colonies vont devenir les canaux du biofilm.

Certains micro-organismes vont pouvoir se détacher du biofilm mature sous l'effet de facteurs environnementaux et se disperser sous la forme planctonique. Ils pourront aller coloniser de nouvelles surfaces. C'est l'étape de dispersion.

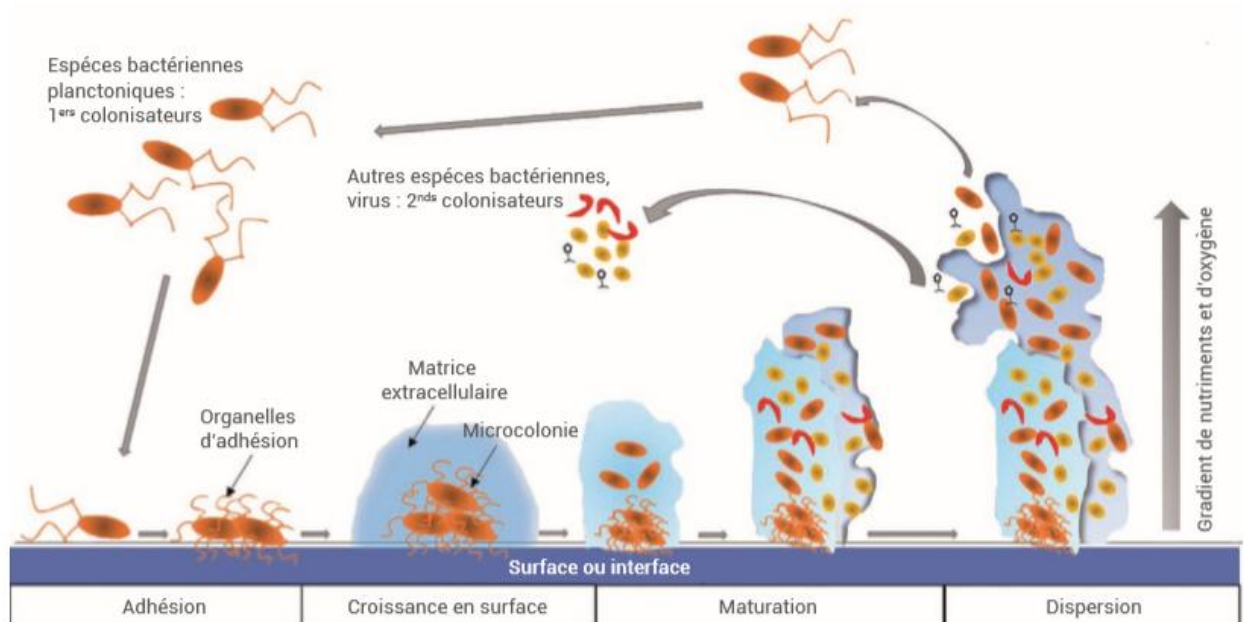


Figure 2 : Schéma de la formation d'un biofilm (Douarche C. et al. (2018))

4.1. Formation d'un film conditionnant

Dès les premières secondes qui suivent l'immersion d'un support en milieu naturel, il y aura une adsorption spontanée de molécules organiques et d'ions (protéines, fragments protéiques, glucides, lipides...) qui recouvrent toutes les surfaces exposées. C'est le phénomène de conditionnement de surface qui est également appelé « film conditionnant » ou encore « film primaire » (Loeb, Neihof, 1975 ; Little, Zsolnay, 1985 ; Pasmore, Costerton, 2003 ; Qian et al., 2007).

Ce film va modifier les propriétés physico-chimiques de la surface (tension de surface, polarité), il va inhiber ou stimuler l'adhésion bactérienne. Des charges négatives peuvent être acquises ce qui va diminuer l'hydrophobicité. Les constituants de ce film vont servir de substrat aux micro-organismes qui vont adhérer à la surface.

Suite à l'accumulation de molécules organiques et inorganiques, la concentration en nutriments est plus élevée sur le support que dans la phase aqueuse, des micro-niches favorables à l'adhésion stable des micro-organismes vont donc se créer. Les micro-organismes y trouvent des nutriments disponibles et/ou des molécules organiques avec lesquelles elles peuvent engager des interactions spécifiques (Kumar & Anand, 1998).

4.2. Le transport des micro-organismes et adhérence

Avant que les micro-organismes (sous forme de cellules planctoniques) puissent s'adsorber sur un support ils sont transportés jusqu'à celui-ci. On distingue différents modes de transport selon le type et la taille des micro-organismes. Les organismes de petite taille (0,01 à 0,1 μm) vont diffuser dans le milieu liquide. Quant aux organismes de plus grandes tailles (0,5 à 10 μm) qui représentent la plupart des micro-organismes, le transport va dépendre des conditions hydrodynamiques. Ils vont pouvoir s'approcher de la surface par différents mécanismes (Marshall, 1985 ; Characklis *et al.*, 1990). Des signaux environnementaux et nutritionnels vont alors attirer ou au contraire repousser les cellules planctoniques. L'approche du support dépend de la nature du milieu dans lequel les micro-organismes évoluent (viscosité et force ionique), et du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, sédimentation). Il existe deux types d'approches des micro-organismes vers le support.

L'approche de type passive est due à l'environnement dans lequel sont les micro-organismes. Le dépôt sur la surface à coloniser va se faire par gravitation, diffusion ou par la force de projection du flux turbulent. Dans le cas d'un flux nul ou faible, on considère si la distance entre le micro-organisme et la surface est supérieur à 10 nm les interactions sont faibles. Elles sont plus fortes à une distance inférieure à 10 nm, l'attraction des particules sur le support va être favorisée (Donlan et Costerton, 2002).

Les micro-organismes peuvent sédimenter, c'est le phénomène de dépôts des particules sous l'action de la pesanteur. Il va être plus important en cas d'agrégation des particules (Dickson, Daniels, 1991).

Les micro-organismes peuvent également se déplacer grâce au mouvement brownien. Ce phénomène naturel est le mouvement désordonné et aléatoire de particules, molécules en suspension dans un liquide (ou gaz) entrant en contact avec les particules de ce fluide (ou gaz) (Van Oss, 1996).

L'approche de type active met en jeu la mobilité intrinsèque des micro-organismes. Le déplacement va s'effectuer généralement grâce aux appendices générateurs de mouvement ; les flagelles ou les pili. Ces appendices vont aider les bactéries à se déplacer dans les milieux aqueux pour s'approcher de la surface à coloniser (Thomas et *al.*, 2002). Les bactéries n'ayant pas d'appendices peuvent adhérer à la surface par des molécules adhésives (par exemple les curli).

Le phénomène de chimiotaxie peut être observé pour certains micro-organismes. Ils se dirigent ou dirigent leurs mouvements en fonction d'un gradient chimique, la concentration de certaines molécules présentes dans leur environnement. En fonction de ce gradient, les bactéries vont être attirées ou repoussées (Pratt & Kolter, 1998).

4.3. Adhésion

4.3.1. Adhésion réversible

Les micro-organismes vont s'approcher du support ce qui conduit à un attachement transitoire. Ils vont établir un contact avec la surface et interagir avec le film conditionnant. Cette première adhésion est l'adhésion réversible. Cette étape dépend de nombreux facteurs dont la surface, le milieu, mais aussi du micro-organisme. Les micro-organismes non mobiles vont adhérer à la surface en utilisant les forces d'interactions ou, en utilisant des éléments de leurs surfaces tandis que ceux qui sont mobiles développent des facteurs d'adhésion impliquant des structures telles que les flagelles, pili ou protéines membranaires, elles sont regroupées sous le terme d'adhésines.

Cette première adhésion des micro-organismes sur un support fait principalement intervenir des liaisons chimiques non covalentes ou des liaisons faibles. En conséquence, elle peut facilement être altérée sous l'influence de facteurs physiques, chimiques ou biologiques. Elle est suivie d'une adhésion secondaire qui est spécifique et irréversible à la surface. La transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, ainsi que d'une profonde modification du profil d'expression des gènes (Schembri, Kjaergaard et Klemm, 2003).

4.3.2. Adhésion irréversible

Cette seconde adhésion correspond à une fixation spécifique des micro-organismes sur un support. Cette adhésion stable est rendue possible grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui vont former des ponts de fixation entre la cellule et la surface ou entre deux cellules. Ces exopolymères ont différents rôles, ils assurent l'attachement irréversible des micro-organismes à la surface, ils permettent le piégeage des éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne, et ils protègent également les micro-organismes des agressions de nature biochimiques, chimiques ou biologiques. Certaines espèces bactériennes ne sont pas capables de s'ancrer elles-mêmes, elles s'intègrent donc à d'autres espèces déjà installées en biofilm.

Selon le type de micro-organisme, les structures d'adhésion vont varier. Pour l'adhésion des bactéries Gram négative, seront impliqués les pili, les curli, les capsules et le glycocalix. Quant à l'adhésion des bactéries Gram positive ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix qui sont impliqués. D'autres structures peuvent également être impliquées (Van Houdt, 2005). Le rôle de ces molécules de surface est de permettre d'établir le contact entre la cellule et une surface ou entre deux cellules.

Les pili ou fimbriae sont présents chez la plupart des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (par exemple, la bactérie *Escherichia coli*). Elles jouent un rôle dans la colonisation de tissus vivants et dans la formation de biofilms. Les bactéries exprimant ces appendices en expriment en moyenne 100 à 500 à leur surface (Beloïn, 2008). Les pili de type I sont essentiels à l'attachement initial à la surface, les

pili de type IV et les flagelles sont des éléments essentiels dans cette étape de formation de biofilm (Davey et O'Toole, 2000).

Les pili de conjugaison interviennent également lors de cette phase. Ils jouent un rôle de stabilisation dans la structure du biofilm, ils mettent un terme à une mobilité désorganisée des bactéries et permettent des interactions stables, l'attachement devient alors irréversible (Beloïn, 2008).

4.4. Croissance et maturation du biofilm

Les phases de croissance et de maturation du biofilm interviennent dès que l'attachement des micro-organismes à la surface devient irréversible.

L'étape de croissance est caractérisée par une multiplication des cellules bactériennes adhérentes à la surface, elle conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir en partie ou en totalité la surface. (Tolker-Nielsen & Molin, 2000).

Ensuite vient l'étape de maturation qui est divisée en deux phases. Durant la première phase, certains gènes sont régulés, provoquant ainsi un changement de phénotype par rapport aux cellules planctoniques. Seront impliqués les gènes codants pour des protéines du métabolisme anaérobie, pour la faible présence d'oxygène au sein du biofilm notamment dans les zones proches du support. Durant la seconde phase, il y aura une synthèse protéique importante différente de celle ayant lieu lors de la première phase (Clutterbuck, 2007).

Les appendices de surface (pili et flagelles), nécessaires lors de l'étape d'adhésion des micro-organismes aux surfaces, vont disparaître lors de cette étape de maturation, laissant place à d'autres éléments nécessaires structuration et la différenciation des cellules bactériennes en biofilm mature (Characklis et Marshall, 1990).

Les micro-organismes vont être entourés d'une matrice extracellulaire. Elle permet d'ancrer les cellules au support, et correspond à une matrice d'exopolymères. Elle est composée de différentes molécules organiques extracellulaires, avec des polysaccharides, des EPS, et parfois des protéines ou des acides nucléiques. Les EPS sont issus de la dégradation des bactéries, mais sont aussi synthétisés et sécrétés par les bactéries lors de leur croissance en biofilm. Leur composition et leur

quantité produite et sécrétée varient en fonction du genre bactérien, de l'âge du biofilm et des facteurs environnementaux (Donlan & Costerton, 2002). L'enrobage des micro-organismes par des EPS a un rôle structural, mais également un rôle protecteur.

4.5. Dispersion du biofilm

Lorsque le biofilm atteint une certaine épaisseur, la dernière étape de formation peut avoir lieu. C'est l'étape de dispersion du biofilm. Ce phénomène de dispersion est induit par le vieillissement du biofilm ou par certains stress ou carences. Des cellules sous la forme planctonique vont être libérées vers le milieu extérieur. Le détachement des micro-organismes est possible grâce à des remaniements génétiques. Ceci va donc permettre de promouvoir la diversité génétique et va également favoriser la colonisation de nouvelles surfaces (Clutterbuck, 2007). On distingue la dispersion passive de la dispersion active.

La dispersion passive est généralement liée aux forces physiques appliquées sur le biofilm. Elle peut être divisée en trois processus qui sont : l'érosion, le relargage (« sloughing ») ou l'abrasion. L'érosion correspond à un détachement continu de cellules individuelles ou de petites parties du biofilm, tandis que le relargage est une perte rapide et massive du biofilm. Quant à l'abrasion, c'est un détachement dû à la collision de particules du fluide liquide avec le biofilm. Le taux d'érosion devient plus important lorsque l'épaisseur du biofilm augmente (Characklis, 1981).

La dispersion active c'est la dispersion des cellules bactériennes contrôlée par des mécanismes biologiques. C'est un détachement « programmé » des cellules. Ce détachement est généralement provoqué par des enzymes (les polysaccharidases), qui dégradent la matrice extracellulaire du biofilm et qui représente alors une source d'énergie. Ces enzymes spécifiques des EPS peuvent probablement être produites durant les différentes étapes de la croissance du biofilm. La dispersion des micro-organismes dans le milieu environnant est accompagnée par l'induction de gènes impliqués dans la mobilité des flagelles pour la nage des bactéries (Sauer et *al.*, 2002).

5. Conditions de développement d'un biofilm

L'attachement des micro-organismes à une surface va dépendre de différents facteurs (Tableau 1 : Facteur influencent la formation d'un biofilm). Les micro-organismes s'attachent de préférence sur les surfaces rugueuses, hydrophobes et qui présente un film conditionnant. Leur fixation va être favorisée lors de l'augmentation de la vitesse du flux, de la température du milieu et aussi de la concentration en nutriments. L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface (Donlan, 2002).

De bonnes conditions nutritives sont nécessaires pour l'étape de formation du biofilm, elles peuvent être moins bonnes pour les phases de développement tardif.

Le tableau 1 ci-dessous regroupe les différents facteurs qui vont influencer la croissance des micro-organismes au sein d'un biofilm (Donlan, 2002).

Propriétés de la surface/support	Propriétés du milieu	Propriétés de la cellule
➤ Texture de la surface ➤ Rugosité de la surface ➤ Hydrophobicité de la surface ➤ Présence d'un film conditionnant à la surface	➤ Vitesse du flux ➤ pH ➤ Température ➤ Cations présents dans le milieu ➤ (Ca^{2+}, Na^{2+}, Fe^{3+}...) ➤ Concentration en Fer et en nutriments ➤ Sources de carbone disponibles ➤ Disponibilité en oxygène dans le	➤ Hydrophobicité de la surface des cellules ➤ Présence d'appendices (fimbriae, flagelles) ➤ Molécules de surface

milieu	
➤ Présence	
d'agents	anti-
microbiens	

Tableau 1: Facteurs influencent la formation d'un biofilm

6. Avantage du mode de vie en biofilm

Le mode de vie en biofilm va conférer aux micro-organismes des avantages.

Le partage de nutriments est facilité au sein du biofilm. L'organisation complexe permet une coopération entre micro-organismes dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes (Tomlin, 2005). Ainsi, le produit de dégradation d'un substrat utilisé par un micro-organisme pourra être utilisé par un autre micro-organisme.

Un biofilm apporte également une protection mécanique, c'est grâce à la matrice d'exopolysaccharides. Elle protège les cellules du biofilm de la dessiccation (Clutterbuck, 2007). Elle empêche également que les micro-organismes soient emportés par le courant. La matrice joue aussi un rôle de barrière filtrante, en empêchant l'entrée dans le biofilm d'antiseptiques, de détergents et d'antibiotiques (Costerton, 1999).

Le mode de vie sous forme de biofilm apporte des avantages d'un point de vue métabolique aux micro-organismes le constituant : économie d'énergie et constitution de réserves. Le mécanisme de capture de substrat est optimisé par l'organisation communautaire du biofilm ce qui permet de réaliser de véritables économies d'énergie. Des réserves énergétiques sont ainsi constituées (Bury-Moné, 2007). Les micro-organismes situés dans les couches internes du biofilm auront une activité métabolique diminuée. De plus, les échangent de matériel génétique entre les micro-organismes est plus facile.

PARTIE 2 : LES BIOFILMS DANS L'INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE

1. Introduction

La présence de biofilms dans l'industrie alimentaire est un réel problème. En effet leurs présences présentent un risque de contamination des aliments et donc un risque pour la santé des consommateurs. Ils peuvent être à l'origine de TIAC (Toxi Infection Alimentaire Collective). Les biofilms peuvent être présents sur différentes surfaces dans l'industrie agroalimentaire ; au sein de l'atelier de production (équipements, murs, sols, circuits d'eau, aération), dans les équipements fermés (circuits de fabrication, circuit de nettoyage) et également sur les ustensiles, éponges, torchons ou les aliments.

Pour lutter contre les biofilms, il est donc nécessaire de nettoyer et désinfecter les équipements, matériaux (ligne de production, ustensiles...) qui vont entrer en contact avec les aliments.

Autrefois, les équipements utilisés pour la transformation des aliments étaient ouverts et nettoyés individuellement. De nos jours, la production à grande échelle dans les industries a conduit à la mise en place de systèmes de Nettoyage-En-Place (NEP). Ils permettent le nettoyage des équipements soit par la circulation de fluides nettoyants, soit par un nettoyage chimique et mécanique, soit par l'impact de jets (par exemple dans le cas des cuves).

Le nettoyage comporte généralement des séquences par cycle de nettoyage, voici un exemple :

- Récupération des produits alimentaires encore présents dans les installations afin de les éliminer des surfaces (pousse à l'eau ou à l'air)
- Pré rinçage : circulation d'eau chaude ou de l'eau froide pour éliminer les substances liées à la surface
- Ajout de détergent : action chimique du nettoyage (acide ou alcalin) qui va agir sur le dépôt de pour favoriser son élimination de la surface
- Post-rinçage : (on parle aussi de rinçage final ou de rinçage intermédiaire) pour éliminer les résidus chimiques par la circulation d'eau avant la désinfection
- Désinfection

- Rinçage final par circulation d'eau avant une nouvelle transformation des produits.

2. Nettoyage en industrie agroalimentaire

2.1. Un nettoyage parfait

Le rôle du nettoyage est d'éliminer toutes traces de salissure présente sur les équipements et matériaux en contact avec les aliments. Ce nettoyage doit se faire, dans la mesure du possible, sans démontage. L'efficacité du nettoyage va dépendre de certains facteurs qui sont : l'action mécanique, l'action chimique (choix du produit de nettoyage), la température et le temps de contact. Ces quatre éléments forment le cercle de Sinner (Wirtanen et Salo, 2003). Il définit et structure la base d'un nettoyage « parfait ». Un nettoyage parfait nécessite l'utilisation de produits adaptés à l'action recherchée (dégraissage, détartrage...), mais aussi aux types de supports à nettoyer. Si l'un des facteurs est diminué, il doit être compensé par les autres facteurs.

2.1.1. L'action chimique

C'est l'action d'un produit alcalin/acide ou d'un détergent sur une surface. La méthode et le produit à employer dépendent de la nature de la souillure et de la surface à nettoyer (type de matériel, fragilité).

2.1.2. L'action mécanique

L'action mécanique c'est l'action de frotter. Elle vise à remettre en suspension les salissures et à les éliminer. Cette action améliore donc l'efficacité des produits de nettoyage en éliminant mécaniquement une partie importante de matières organiques collées à la surface.

2.1.3. La température

Elle correspond à la température de l'eau. La température joue un rôle important sur l'efficacité des produits de nettoyage. Il est important de respecter la température recommandée par le fabricant pour optimiser l'efficacité du produit. A défaut de recommandations du fabricant, il faut préférer l'eau tiède (les mains doivent tolérer la température de l'eau).

2.1.4. Le temps de contact

Ce facteur, le temps d'action ou temps de contact, c'est le temps nécessaire pour que le détergent réagisse avec les salissures afin de pouvoir les déloger. Pour un désinfectant, c'est la durée nécessaire pour que celui-ci inactive un organisme. Ce temps est évalué en laboratoire. Lors de l'application d'un désinfectant sur une surface, il est important de respecter les recommandations du fabricant.

2.2. Les agents de nettoyage

2.2.1. Les agents de nettoyage alcalins

Les produits de nettoyage alcalins ont un pH supérieur ou égal à 8. Ils ont différents rôles : enlever la croûte organique collée sur la surface par des traitements de chaleur, saponifier les lipides saponifiables, dissoudre les matières grasses et dégrader les protéines en acides aminés les ioniser puis les solubiliser. Il y a quatre classes d'agents alcalins décrits ci-dessous (Dupuis et *al.*, 2003).

Les alcalins forts

Les alcalins forts ont une action très puissante sur les résidus organiques. Cependant, cette catégorie d'agents est corrosive, il est donc préférable de limiter leur utilisation sur les métaux mous et le caoutchouc. (Dupuis et *al.*, 2003).

Les alcalins moyens

Cette classe contient principalement les phosphates, ils ont un bon pouvoir adoucissant sur l'eau. L'utilisation des alcalins moyens est de plus en plus limitée car ils ont des effets néfastes sur l'environnement (Dupuis et *al.*, 2003).

Les alcalins doux

Cette catégorie d'alcalin regroupe principalement des carbonates. Les alcalins doux sont utilisés pour le nettoyage d'équipements en aluminium ou tout autre métal mou. Ils sont également utilisés pour le nettoyage manuel nécessitant un brossage. (Dupuis et *al.*, 2003).

Les alcalins chlorés

Ils sont souvent utilisés pour aider à décoller les résidus protéiques. L'inconvénient majeur de ces produits est qu'avec le temps, ils endommagent les équipements, surtout si les concentrations recommandées par le fabricant ne sont pas respectées (Dupuis et *al.*, 2003).

2.2.2. Les agents de nettoyage acides

Le rôle des produits de nettoyage acides est de dissoudre les résidus minéraux résultant des aliments, de l'eau ou des réactions chimiques (par exemple : eau/aliments ou eau/aliments/produits de lavage alcalin). On distingue deux classes parmi les agents de nettoyage acides : les acides minéraux et les acides organiques (Dupuis et *al.*, 2003).

Les acides minéraux

Les acides minéraux sont couramment utilisés pour leurs propriétés détartrantes et désincrustantes. Les plus courants sont l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique, l'acide sulfurique et l'acide sulfamique. Tous ces acides sont corrosifs et oxydants même pour l'inox (Dupuis et *al.*, 2003).

Les acides organiques

Les acides organiques sont moins dangereux et moins corrosifs que les acides minéraux, car ce sont des acides faibles. Ils ont un pouvoir séquestrant sur certains minéraux. Les acides organiques ayant une plus faible corrosivité peuvent être utilisés sur les métaux mous tel l'aluminium. Les acides lactiques, citriques, gluconiques, et hydroxyacétiques sont les plus utilisés (Dupuis et *al.*, 2003).

2.2.3. Les détergents enzymatiques

Les détergents enzymatiques sont constitués d'un ou de plusieurs enzymes. Leur utilisation peut être judicieuse pour surmonter le problème des biofilms dans l'industrie alimentaire. La matrice d'exopolysaccharides étant hétérogène, un mélange d'enzymes peut être nécessaire pour sa dégradation (Simoes et *al.*, 2010). Les mélanges peuvent être composés d'enzymes telles que les protéases (pour dégrader les protéines), les lipases (pour dégrader les lipides) ou les amylases (pour dégrader l'amidon).

2.3. La désinfection

La désinfection c'est l'utilisation de produits antimicrobiens pour inactiver, détruire les micro-organismes présents sur un objet ou sur une surface. Elle a pour but de réduire les cellules viables restantes après le nettoyage et d'empêcher leur croissance sur les surfaces après nettoyage. En absence de matière organique (par exemple graisse ou sucre), les désinfectants sont plus efficaces, la désinfection ne peut être efficace qu'après un nettoyage. L'efficacité est également influencée par d'autres paramètres tels que la concentration et le temps de contact du produit, le pH, la température, la dureté de l'eau (Cloete et *al.*, 1998).

Le résultat de la désinfection est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération. Elle n'empêche pas les contaminations ultérieures, c'est pourquoi elle doit être renouvelée régulièrement dans les zones sensibles.

En industrie alimentaire, la désinfection a pour but de réduire le nombre de micro-organismes afin qu'ils ne puissent pas affecter la qualité et la sûreté des produits alimentaires (Vloková et *al.*, 2008).

Il existe différentes classes de désinfectants selon leur action.

2.3.1. Halogènes et dérivés

En industrie, l'un des produits désinfectants le plus couramment utilisé est l'hypochlorite de sodium (eau de javel). Ce composé possède une puissante activité désodorisante ainsi qu'un large spectre d'activité sur les micro-organismes. Les halogènes vont détruire les micro-organismes en détruisant les protéines membranaires et chromosomiques. L'hypochlorite de sodium va libérer un agent antimicrobien lors de sa dissociation dans l'eau : de l'acide hypochlorique (HOCl). Cet agent traverse facilement les parois et membrane des micro-organismes. Il agit ensuite par un mécanisme d'oxydation générale entraînant la dénaturation des protéines, provoquant ainsi l'arrêt des réactions du métabolisme et la mort cellulaire.

Les halogènes et dérivés sont efficaces à basse température et il ne laisse pas de résidus sur les surfaces. De plus ils ne coûtent pas cher (Massicotte, 2009).

2.3.2. Aldéhydes

Les aldéhydes sont bactéricides à des concentrations élevées sur les bactéries Gram négative. Ils ont également des qualités fongicides, virucides, mycobactéricides et sporicides. Ils provoquent une dénaturation des acides nucléiques et des protéines des micro-organismes. Les principaux produits faisant partie de cette catégorie de désinfectants sont : le formaldéhyde, le glutaraldéhyde et l'aldéhyde succinique (Massicotte ,2009). En présence d'une solution alcaline, l'activité des aldéhydes diminue.

L'activité des aldéhydes diminue en présence d'une solution alcaline. En industrie, le formaldéhyde n'est actuellement plus utilisé car il est suspecté cancérigène. Le glutaraldéhyde présente un spectre d'activité large. Il est utilisé en association avec des ammoniums quaternaires (Khamisse, 2013).

2.3.3. Les alcools

Les alcools agissent rapidement contre les bactéries Gram négative et Gram positive (en 30 secondes). Ils dénaturent les protéines cytoplasmiques et membranaires et

inhibent la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Parmi les alcools les plus utilisés, on trouve les l'éthanol et l'isopropanol.

L'alcool est souvent utilisé en association avec d'autres substances, par exemple les dérivés du phénol, cela permet d'en améliorer les capacités bactéricides. L'alcool est inefficace contre les spores et les virus. Il s'évapore rapidement et, est inactivé par les matières organiques. Il a tendance à faire coller les débris organiques sur les supports (Massicotte, 2009).

2.3.4. Oxydants

Les oxydants agissent en formant des radicaux libres qui vont interagir avec les lipides membranaires, ADN et ribosomes. Un oxydant utilisé en industrie : le peroxyde d'hydrogène. Les produits à base de peroxyde d'hydrogène réagissent très rapidement avec la matière (de quelques secondes à quelques minutes). Ils endommagent peu les surfaces inertes sauf les celles composées de fer, facilement oxydables (Massicotte, 2009).

2.3.5. Les dérivés phénoliques

Ils possèdent une action bactéricide et fongicide. Les dérivés phénoliques sont bactériostatiques à une concentration de 0,2 % et bactéricides à partir de 1 %. Lorsqu'ils sont dissous dans l'eau, ils ont une excellente activité contre les mycobactéries et les virus (Massicotte, 2009).

Ces produits désinfectants sont inactivés par les détergents, les matières organiques et l'eau dure. Leur activité est réduite en augmentant le pH de la solution. De plus, ils sont incompatibles avec le fer, l'hypochlorite et les ammoniums quaternaires. Les phénols sont corrosifs pour les métaux et de nombreux autres matériaux lorsqu'ils sont présents à concentration élevée (Massicotte, 2009).

2.3.6. Les ammoniums quaternaires

Les ammoniums quaternaires ont un pouvoir détergent donc, ils entrent dans la composition de nombreux produits détergents/désinfectants. Ils ont une activité bactériostatique sur les bactéries Gram négative et bactéricide sur les bactéries Gram positive, leur activité est variable sur les virus enveloppés et nulle sur les virus nus. Ils sont également fongistatiques, par contre ils n'ont aucune action sur les spores.

La plupart des ammoniums quaternaires sont peu toxiques et ils s'attaquent peu aux surfaces. Ils sont stables dans l'eau chaude. Les souillures protéiques et la dureté de l'eau réduisent fortement l'efficacité de ces composés (Massicotte, 2009).

2.3.7. Les biguanides

Ces molécules vont modifier la perméabilité de la membrane cellulaire en se liant aux acides gras et aux groupes phosphates. Le constituant cellulaire va être libéré. Les biguanides sont inactivés par les dérivés anioniques, sulfates et sulfonates. Elles sont compatibles avec les acides, les ammoniums quaternaires et les détergents non ioniques. Les biguanides ont l'avantage de ne pas être corrosifs et d'être faiblement toxiques.

PARTIE 3 : CHOIX DES PRODUITS POUR LUTTER CONTRE LES BIOFILMS

1. Introduction

Dans cette partie, nous chercherons à sélectionner les produits les plus adaptés dans le cadre de la lutte contre les biofilms. Dans un premier temps les salissures seront associées aux produits nettoyants. Ensuite, les désinfectants seront choisis en fonction de différents critères.

2. Choix du produit de nettoyage

On distingue différentes types de souillures. Les souillures minérales ; par exemple la poussière, le tartre ou le calcaire. Le tartre est constitué de carbonate de calcium et de phosphate de calcium. Riche en calcium et magnésium, l'eau dure favorise la formation du tartre. Le tartre se dépose sur les surfaces et adhère fortement, il constitue un réservoir pour les micro-organismes. Les souillures organiques sont d'origine animale, végétale ou humaine ; elles regroupent les glucides, les lipides et les protéines. L'état de la souillure aura une influence sur le nettoyage, une souillure sèche sera plus difficile à éliminer qu'une souillure humide.

Il est nécessaire de connaître de type de souillure à éliminer ainsi que le type de support (matériel) à nettoyer pour le choix du produit nettoyant. Le tableau 2 : Choix du produit nettoyant en fonction des souillures ci-dessous regroupe les différentes souillures rencontrées dans les industries alimentaires. Ces souillures ont été associées aux nettoyants les plus adaptés.

Type de souillure	Détergents adaptés
Souillures minérales	
Terre, sable, poussière	Détergent neutre
Tartre ou calcaire	Détergent acide (détartrant)
Souillures organiques (alimentaire)	
Souillures fraîches de protéines et graisses (présente sur les surfaces impliquant un nettoyage manuel)	Détergent alcalin doux avec un pH proche de la neutralité

Encrassement léger	
Salissures blanchissables (fruits, café, vin...)	Détergent alcalin doux
Graisses cuites ou séchés	Détergent alcalin moyen (pH compris entre 9 et 12,5)
Graisses carbonisés (friteuse, grill, four...)	Détergent alcalin fort (pH compris entre 13,5 et 14)
Résidus sucrés	Détergent acide

Tableau 2: Choix du produit nettoyant en fonction des souillures

Afin d'obtenir un bon résultat après le nettoyage, il est nécessaire de respecter les concentrations recommandées. Une variation de concentration d'un produit de nettoyage n'est pas sans conséquences. Lorsque celle-ci est trop élevée, l'étape de rinçage peut être plus difficile et il y a également un risque que des traces du produit soient présentes sur les surfaces. De plus, cela entraîne une perte de produit sans pour autant améliorer les résultats du nettoyage. Lorsque la concentration du produit de nettoyage est faible le résultat du nettoyage est mauvais, les souillures ne sont pas toutes nettoyées.

3. Choix du produit désinfectants

Après le nettoyage, il est nécessaire d'effectuer une opération de désinfection avec un désinfectant approprié. Cette étape permettra d'éliminer les micro-organismes présents sur les surfaces. Le désinfectant doit être choisi selon certains critères :

- Le type de micro-organismes à éliminer (bactérie Gram -, bactérie Gram+, moisissures etc.)
- Les conditions dans lesquelles l'opération de désinfectant pourra se dérouler (temps disponible pour l'opération, plage de pH, plage de températures, présence de souillures)
- Le support à désinfecter

3.1. Choix en fonction des produits manipulés et micro-organismes

D'après le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF), les industries agroalimentaires regroupent les secteurs de l'industrie alimentaire ainsi que les secteurs de la fabrication de boissons. Ces secteurs correspondent aux divisions 10 et 11 de la Nomenclature d'Activités Française (NAF). Les différents secteurs sont décrits ci-dessous, dans le tableau 3 : Secteurs d'activité en IAA (INSEE).

Code NAF	Secteur
10.1	Transformation et conservation de la viande et préparation de produits à base de viande
10.2	Transformation et conservation de poisson, de crustacés et de mollusques
10.3	Transformation et conservation de fruits et légumes
10.4	Fabrication d'huiles et graisses végétales et animales
10.5	Fabrication de produits laitiers
10.6	Travail des grains ; fabrication de produits amylacés
10.7	Fabrication de produits de boulangerie-pâtisserie et de pâtes alimentaires
10.8	Fabrication d'autres produits alimentaires
10.9	Fabrication d'aliments pour animaux
11.0	Fabrication de boissons

Tableau 3 : Secteurs d'activité en IAA (INSEE)

Etant donnée la diversité des secteurs d'activité en industrie agroalimentaire, nous n'identifierons que des micro-organismes pathogènes ainsi que les aliments auxquels ils sont associés, tableau 4 : Micro-organismes et virus identifiés et aliments associés. Les micro-organismes pathogènes ne sont pas les seuls présents mais, ils sont dangereux pour les consommateurs. En fonction des produits utilisés, nous pourrons choisir quelle activité devra avoir les désinfectants sélectionnés (large spectre d'activité ou activité ciblée).

Dans les industries manipulant de la viande, les micro-organismes présents seront plutôt : *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*... Ces derniers sont des bactéries, pour le choix du désinfectant il sera donc judicieux

d'utiliser un bactéricide et un sporicide (car certaines bactéries peuvent être sous forme de spores).

Dans les secteurs de transformation et conservation de poisson, de crustacés et de mollusques, des bactéries (par exemple : *Staphylococcus aureus*) ainsi que des virus (Hépatite A) peuvent être présents. Il faudra donc utiliser un désinfectant avec une activité bactéricide et virulicide.

Les industries qui conservent et transforment des céréales devront quant à elles être vigilantes aux champignons (par exemple : *Aspergillus flavus*). En effet, certains champignons produisent des toxines dangereuses pour l'homme.

Micro-organismes		Principaux aliments associés
Bactérie	<i>Salmonella spp.</i> Gram-	Œufs, produits à base d'œufs, viande crue (bovine, porc, volaille)
	<i>Staphylococcus aureus</i> Gram+	Lait, produits laitiers, viande, œufs, produits à base d'œufs, charcuterie, volaille, poisson, fruits de mer
	<i>Clostridium perfringens</i> Gram+	Viande, volaille, poisson, fruits de mer
	<i>Bacillus cereus</i> Gram+, spores	Lait cru, viande, végétaux, produits amylacés (plat à base de riz ou pâte)
	<i>Clostridium botulinum</i> Gram+, spores	Aliments en conserve, jambon cru, mie
	<i>Escherichia coli</i> Gram-	Viandes, lait cru, steaks hachés
	<i>Campylobacter jejuni</i> Gram-	Lait cru, viande, volailles
	<i>Listeria monocytogenes</i> Gram+	Lait cru, fromages à pâte molle, glace, poissons fumés, légumes crus, charcuterie
	<i>Yersinia enterocolitica</i> Gram-	Lait cru, glace, végétaux, porc cru
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Fruits de mer, viande rouge, volaille, lait cru

	Gram-	
	<i>Shigella</i>	Légumes crus, fruits crus, lait, steaks hachés
	Gram-	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Fruits de mer, poissons, viande
	Gram-	
Champignons	<i>Aspergillus clavatus</i> (toxine)	Pommes altérées ou les jus de fruits
	<i>Penicillium expansum</i>	Pommes altérées ou les jus de fruits
	(toxine)	
	<i>Aspergillus flavus</i>	Graines d'oléagineux, dans les tourteaux, céréales
	(aflatoxine)	
	<i>Aspergillus ocraceus</i> et	Maïs
	<i>Penicillium viridicatum</i>	
	(ochratoxines)	
	<i>Penicillium citrinum</i> (citrine)	Orge et le riz mois
Virus	Hépatite A	Fruits de mer crus ou pas assez cuits ou d'autres produits crus contaminés, eaux contaminées
	Norovirus	Fruits de mer crus, eaux contaminées

Tableau 4 : Micro-organismes et virus identifiés et aliments associés (Bourgeois et. al., 1996 ; Haeghebaert et al., 2002 (cité par ZULIANI et GARRY,2004), fiche ANSES)

3.2. Action des désinfectants

Après avoir choisi le type d'activité recherché, les désinfectants peuvent être sélectionnés. Les désinfectants présentent des spectres d'activité différents. Certains désinfectants ont une action sur plusieurs micro-organismes tandis que d'autres sont actifs seulement sur un type de micro-organismes. L'efficacité d'une substance désinfectante dépend de nombreux paramètres comme le temps de contact, la température, la concentration, le pH...

Il existe des tests normalisés pour juger l'effet des produits sur chaque type de micro-organisme. Ces normes spécifient aux fabricants:

- les souches qui doivent être testées en fonction de l'activité recherchée
- les techniques à suivre pour évaluer l'action biocide sur les souches
- les domaines d'activité (agroalimentaire, médicale...) et les surfaces (ou objets) à traiter.

La norme NF EN 14885 (octobre 2015), spécifie les normes européennes auxquelles les produits doivent être conformes afin de soutenir les revendications d'activité microbicide auxquelles il est fait référence. Il est recommandé de prendre un produit qui répond aux normes biocides recherchés. Cette information figure sur l'étiquette du produit.

Ces normes portent sur des essais dans des conditions idéales en laboratoire, en présence de souillures ou non. En fonction des résultats obtenus lors des tests normalisés, il est possible d'estimer un spectre d'activité des principaux désinfectants. Ce spectre d'activité est représenté dans le tableau 5 : Spectre d'activité des désinfectants. Nous remarquons que les désinfectants du type Halogène et dérivé (qui englobe les produits chlorés) ont un spectre d'activité relativement complet. Par contre, les ammoniums quaternaires ont une activité plus sélective.

L'action des dérivés phénoliques sur micro-organismes varie en fonction de la nature des molécules qui sont associées au groupement phénol. L'activité biocide des ammoniums quaternaires est également variable d'un composé à un autre.

Désinfectant	Micro-organismes					
	Bactérie Gram positive	Bactérie Gram négative	Mycobactérie	Moisissure et levure	Virus	Spore
Halogènes et dérivés	+	+	+	+	+	+
Aldéhydes	+	+	+	+	+	+
Alcools	+	+	+	+/-	+/-	-
Oxydants	+	+	+	+/-	+/-	+/-
Dérivés phénoliques	+	+	+	+	-	-
Ammoniums quaternaires	+	+/-	-	+	+/-	-
Biguanides	+	+	+/-	+/-	+/-	-

Tableau 5 : Spectre d'activité des désinfectants (CAPP-INFO 2007, CRITT Agroalimentaire PACA 2015, INRS, Christine David et Isabelle Balty 2014)

+ : Bonne activité

+/- : Activité moyenne

- : Pas d'activité

3.3. Avantages et inconvénients des désinfectants

Il existe différentes classes de désinfectant avec des actions différentes sur les micro-organismes cible. Ils présentent tous des avantages et inconvénients qui sont regroupés dans le tableau 6 : Avantages et inconvénients des désinfectants, ci-dessous. Les avantages et inconvénients pourront aider lors du choix du produit désinfectant.

Certains désinfectants ont un large spectre d'activité, c'est-à-dire qu'ils vont pouvoir agir sur différents micro-organismes. Ces types de produits sont avantageux pour les industries manipulant divers produits alimentaires. Le coût d'un produit influence les industries. En effet, un désinfectant peu coûteux sera plus intéressant pour l'industriel.

La toxicité, la corrosivité ou la sensibilité à certains paramètres (par exemple la sensibilité à la température) sont des inconvénients pour un produit désinfectant.

Désinfectant		Avantages	Inconvénients
Halogènes et dérivés	Composés chlorés	➤ Peu couteux ➤ Large spectre d'activité (bactéricide, microbicide) ➤ Utilisation possible en milieu alcalin (intéressant pour le nettoyage) ➤ Utilisation possible en nettoyage et désinfection ➤ Peu ou non moussant ➤ Facilement rinçable ➤ Manipulation aisée	➤ Toxique ➤ Corrosif ➤ Risques de corrosion sur inox à pH supérieur à 8,0 ➤ Risques d'accident en cas de mélange avec un acide ➤ Instabilité à chaud ➤ Perte de l'efficacité au stockage ➤ Sensibilité aux matières organiques ➤ Décoloration des produits
	Composés iodés	➤ Peu toxique ➤ Large spectre bactéricide (moins actif que le chlore sur les spores plus actif sur les cellules végétatives) ➤ Grande activité à faible dose ➤ Efficace à froid	➤ Cout élevé ➤ Instable à température élevée ➤ Corrosif à pH acide ➤ Coloration de certaines matières (caoutchouc, matières plastiques) ➤ Inefficace à pH alcalin

- Peut être utilisé en détartrage et désinfection
 - Manipulation aisée

- Stockage à température inférieure à 40°C (mauvaise tenue au stockage)
- peut être instable à la lumière
 - Très moussant
 - Difficilement rinçable
 - Sensibilité aux matières organiques
- Sensibilité à la dureté de l'eau (sauf pour les iodophores très acides)

Aldéhydes

Glutaraldéhyde

- Peu cher
 - Spectre d'activité large (bactéricide, fongicide, virulicide, sporicide)
 - Action très rapide
- Efficace à faibles concentrations
 - Peu toxique
- Peu sensible aux matières organiques
 - Peu corrosif

- Mise en formulation plus délicate pour obtenir des solutions actives stables
- Détérioré les plastiques

Alcools

- Action rapide
- Incolore
- Efficace contre les cellules végétatives
- Non toxique,
- Inoffensif pour la peau
- Soluble dans l'eau
- Ne laissent pas de résidus sur les surfaces du fait de leur volatilité
- Facile à utiliser
- Inflammables
- Produits coûteux
- Microbistatique
- Pas efficace contre les spores

Oxydants

Eau oxygéné

- Efficace sur bactéries Gram positives et négatives
- Utilisation en milieu acide ou neutre
- Pas de résidus toxiques
 - Non corrosif
 - Non moussant
- Facilement rinçable
- Spectre essentiellement bactéricide (faible efficacité sur spores, levures et moisissures)
- Surtout efficace à température supérieure à 60 °C.
- Temps de contact plus long
- Sensibilité aux matières organiques
- Perte d'efficacité au stockage

Acide paracétique	➤ Spectre microbicide complet (bactéries, spores, levures, moisissures, virus, bactériophages) ➤ Efficace à basse température ➤ Utilisation en milieu acide (facilite le détartrage) ➤ Non moussant ➤ Facilement rinçable ➤ Stable au stockage ➤ Pas de résidus toxiques	➤ Corrosif en présence de chlorures ➤ Sensibilité aux matières organiques ➤ Corrosif sur laiton, bronze, cuivre
Dérivés phénoliques	➤ Bactéricide et fongicide ➤ Efficace à faible concentration	➤ Sensibilité aux détergents, aux matières organiques et à l'eau dure ➤ Incompatibles avec le fer, l'hypochlorite et les ammoniums quaternaires ➤ Peut être corrosif à forte concentration ➤ Risque de dégradation du

		caoutchouc
Ammoniums quaternaires	➤ Efficace contre les bactéries Gram positives, levures moisissures ➤ Empêche un nouveau développement microbien ➤ Favorise le détachement microbien ➤ Bon pouvoir mouillant ➤ Très grande stabilité ➤ Non corrosif ➤ Utilisation en milieu acide, neutre ou alcalin ➤ Peu toxique ➤ Inodore ➤ Sans goût	➤ Produit coûteux ➤ Spectre bactéricide sélectif (Gram positives, levures, moisissures) ➤ Pas efficace à pH bas ➤ Sensible à la présence de souillures ➤ Moussant ➤ Difficilement rinçable (contrôle obligatoire du rinçage) ➤ Inhibé par les agents anioniques ➤ Seules certaines molécules sont autorisées en laiterie
Biguanidines	➤ Peu corrosifs ➤ Non moussants ➤ Peu influencés par les matières organiques	➤ Produit coûteux ➤ Efficace à pH compris entre 6 et 8,5 ➤ Spectre d'activité limité (actif

➤ Incolores	sur bactéries, peu actif sur
➤ Facilement rinçables	moisissure et pas actif sur champignon et spores)

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des désinfectants (Jean-Claude Belloin 1993, Nassima-Didouh 2015, J M 2011, Massicotte 2009)

4. Nature de la surface

Le choix du produit nettoyant ainsi que du désinfectant dépend également de la nature de la surface, du type de matériau. Les produits nettoyant et désinfectant peuvent avoir des effets néfastes sur les surfaces. Elles peuvent être abimées suite au non respect des paramètres de l'opération, par exemple une plage de pH non adaptée, une température trop élevée ou des concentrations en produits non respectées.

Le tableau 7 : Nettoyage/Désinfection : Risques en fonction de la nature des surfaces, regroupe quelques matériaux utilisés en industrie agro-alimentaire ainsi que des produits qui ne leur sont pas adaptés. L'utilisation de certains types de produits peut entraîner des risques de corrosion. C'est le cas des produits chlorés, dont l'utilisation sur des matériaux de type acier, acier inox présente un risque de corrosion. Il est donc préférable d'utiliser d'autres produits. Ce tableau n'est pas exhaustif, d'autres matériaux sont également utilisés en IAA. Il est donc nécessaire, avant toutes utilisations d'un produit sur une surface, de vérifier la compatibilité, mais aussi les conditions d'utilisation.

Nature de la surface	Détergent	Désinfectant
Acier inox	➤ Alcalin chloré : risque de corrosion ➤ Ne pas utiliser l'acide chlorhydrique	➤ Produits chlorés : risque de corrosion ➤ Produits de désinfection concentrés ou chauds
Acier	➤ Acides nitrique et sulfurique : corrosion rapide de l'acier ➤ Acide phosphorique à faible concentration, pH inférieure à 3 : corrosion	➤ Alcalins chlorés, pH inférieure à 8 : l'acier rouille
Aluminium et alliages	➤ Alcalin fort non silicaté : attaque de l'aluminium ➤ Acides chlorhydrique et sulfurique : attaque	➤ Produits iodés : risque de corrosion légère

uniforme du matériau		
Fer étamé	➤ Alcalin : couche d'étain attaquée (corrosion qui peut être inhibée par la présence de silicates dans le produit) ➤ Acide : couche d'étain attaquée	
Caoutchouc	➤ Alcalin : risque de dégradation à haute température et forte concentration ➤ Acide : risque d'attaque	➤ Produits chlorés et iodés attaquent le caoutchouc ➤ Dérivés phénoliques : risque de dégradation
Matières plastiques	➤ Acides oxydants : durcissent les plastiques (risque de créer des fissures)	

Tableau 7 : Nettoyage/Désinfection : Risques en fonction de la nature des surfaces (Le point sur le nettoyage », INTERBEV, juillet 1998 cité par CRITT Agroalimentaire PACA 2015)

5. La « meilleure méthode » de lutte contre le biofilm

Une fois les micro-organismes à éliminer, les types de supports ou surfaces à traiter et les paramètres de l'opération nettoyage/désinfection identifiés nous pouvons choisir des produits. Pour retenir un seul produit, il sera nécessaire d'étudier les avantages et inconvénients. Il ne faut pas oublier les incompatibilités entre nettoyeurs et désinfectants (se référer aux consignes d'utilisation). La toxicité ainsi que la protection de l'utilisateur sont également importantes à prendre en compte.

Nous voulons savoir s'il y a une bonne méthode de lutte contre les biofilms pour chaque secteur d'activité en IAA. Chaque industrie possède des équipements, des produits alimentaires ainsi que des procédés propres à son activité. Or, comme décrit précédemment, il existe des incompatibilités produit/produit, produit/matériau et

produit/paramètres de l'opération de nettoyage/désinfection. Il nous est donc difficile d'associer un produit à un secteur d'activité.

La meilleure manière de combattre les biofilms en IAA est la connaissance de son industrie et des processus de fabrication.

Le respect des consignes d'utilisation est aussi un point important dans le cadre de la lutte contre les biofilms. Une opération de nettoyage et désinfection ne respectant pas les paramètres indiqués par le fournisseur (concentration, temps de contact, plage de pH, température, etc.) peut être inefficace. Par exemple, un produit désinfectant peut avoir une action bactéricide et sporicide à une concentration donnée, mais une diminution de cette concentration peut supprimer l'une des deux actions.

L'utilisation d'un désinfectant à une concentration plus faible de conseillée peut entraîner l'apparition de micro-organismes résistants. Afin d'éviter le phénomène de résistance des micro-organismes à un produit donné, il est recommandé de changer régulièrement de produit désinfectant (INRS, David et Isabelle Balty, 2014).

CONCLUSION

A travers ce mémoire, nous avons mis en évidence les différentes étapes à suivre afin de choisir un produit nettoyant et un produit désinfectant qui vont nous permettre de garantir une bonne hygiène au sein des IAA. Le fait de respecter le processus de nettoyage et désinfection va permettre d'éliminer un maximum de micro-organismes et donc de limiter la formation des biofilms.

Les informations présentées dans ce mémoire permettent de choisir quelques produits nettoyant ainsi que des produits désinfectants en fonction du type d'aliments présents. Leurs avantages et inconvénients vont permettre de restreindre ce choix.

Cependant, il est impossible pour nous de choisir la bonne méthode d'élimination des biofilms. En effets, chaque IAA est équipé de matériaux différents, or il existe des incompatibilités entre les produits utilisés et la matière des surfaces. De plus, des incompatibilités sont également observées entre les produits et leurs conditions d'utilisation. De ce fait, chaque IAA aura sa propre méthode.

Nous pouvons conclure que pour le choix des détergents et désinfectants il est primordial de connaître son industrie, c'est-à-dire les caractéristiques de l'opération (temps, plage de pH, plage de températures) ainsi que les équipements. Il faudra suivre les conseils d'utilisation des produits pour une destruction optimale des micro-organismes. D'autres méthodes sont en cours de développement comme l'utilisation de produits à base d'enzymes, de phages, ou de molécules de plantes. Il serait intéressant de les connaître.

BIBLIOGRAPHIE

Belloin JC., (1993). L'hygiène dans l'industrie alimentaire Les produits et l'application de l'hygiène. Etude Fao Production Et Santé Animales 117.

Beloin C., Roux A., Ghigo JM., (2008). Escherichia coli biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322, 249-289.

Bendinger B., Rijnaarts HHM., Altendorf K., Zehnder AJB., (1993). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3973–3977.

Characklis WG., (1973). Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research* 7 (9), 1249-1258

Characklis WG., (1981). Bioengineering report: fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 23, 1923-1960.

Characklis WG., McFeters GA., Marshall KC., (1990). Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis WG., Marshall KC., eds. *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons, 341-394.

Cloete TE., Jacobs L., Brozel VS., (1998). The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 9, 23–37.

Clutterbuck AL., Woods EJ., Knottenbelt DC., Clegg PD., Cochrane CA., Percival SL., (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121 (1-2), 1-17.

Costerton JW., Geesey GG., Cheng KJ., (1978). How bacteria stick. *Scientific American* 238(1), 86-95.

Costerton JW., Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Korber D., James G., (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176, 2137-2142.

CRITT Agroalimentaire PACA, (2015). Dossier Technique Nettoyage et Désinfection.

Davey ME., O'Toole GA., (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 847-867.

Dickson JS., Daniels EK., (1991). Attachement of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* to glass as affected by surface film thickness. Cell density and bacterial motility. *Journal of Industrial Microbiology* 8, 281-283.

Didouh N., (2015). Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection.

Donlan RM., (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8 (9), 881-890.

Donlan RM., Costerton JW., (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 167-193.

Douarche C., Bailleux V., Even C., Allain JM., Regnard C., Raspaud E., (2018). La mécanique des biofilm à la surface de liquides. *Reflets de la physique* 56, 20-24.

Flemming H-C., Wingender J., Griegbe, Mayer C., (2000). Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV., ed. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 19–34.

Fletcher M., Loeb GL., (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 67–72.

Haeghebaert S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallay A., Espié E., Vaillant V., (2002). Les toxiinfections alimentaires collectives en France en 2001. Bulletin épidémiologique hebdomadaire 50.

Henrici AT., (1933). Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology* 25, 277-287.

INRS, David C., Balty I., (2014). La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie.

James GA., Beaudette L., Costerton JW., (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 15, 257–262.

- Kaestli LZ., Vogt-Ferrier N., (2007). Désinfectants et antiseptiques. CAPP-INFO 46.
- Kumar CG., Anand SK., (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9-27.
- Little BJ., Zsolnay A., (1985). Chemical fingerprinting of adsorbed organic materials on metal surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 104, 79-86.
- Loeb GI., Neihof RA., (1975). Marine conditioning films. *Advances Chemical Series* 145, 319–335.
- Macguire, J., Krisdhasirna V., (1992). Surface thermodynamics, protein adsorption and biofilm development In Physical Chemistry of Food. In : Scharzberg HG., Wartel RW. eds. *Physical Chemistry of Food*. United States, New York, Marcel Dekker, 747
- Marshall KC., (1985). Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In : Savage DC. and Fletcher M. eds. *Bacterial adhesion*. Plenum Publishing Corp., New York, 133-161.
- Massicotte R.,(2009). Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Édition : La Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec.
- Pasmore M., Costerton, JW., (2003). Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 407- 413.
- Pratt LA., Kolter R., (1998). Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30, 285-293.
- Pringle JH., Fletcher M., (1983). Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 811–817
- Qian PY., Lau S., Dahms HU., Dobretsov S., Harder T., (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology* 9, 399-410

- Sauer K., Camper AK., Ehrlich GD., Costerton JW., Davies DG., (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, 1140-1154.
- Schembri MA., Kjaergaard K., Klemm P., (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology* 48, 253-267.
- Stoodley P., Boyle JD., Dodds I., Lappin-Scott HM., (1997). Consensus model of biofilm structure. In: Wimpenny JWT., Gilbert PS., Lappin-Scott HM., Jones M., eds. *Biofilms: community interactions and control*. Cardiff, UK: Bioline, 1–9.
- Sutherland I., (2001). Biofilm exopolysaccharide: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- Thomas WE., Trintchina E., Forero M., Vogel V. Sokurenko EV., (2002). Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* 109, 913-923.
- Tolker-Nielsen T., Molin S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology* 40, 75-84.
- Tomlin KL., Malott RJ., Ramage G., Storey DG., Sokol PA., Ceri H., (2005). Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9), 5208- 5218.
- Van Houdt R., Michiels C., (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology* 156, 626-633.
- Vlokova H., Barak V., Seydlova R., Pavlik I., Schlegelova J.(2008). Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and in the Dairy Industry: Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms- a review. *Czech Journal of Food Sciences* 26, 309–332.
- Wanner O., Bauchrowitz M. (2006). Les biofilms sont omniprésents. *Eawag News* 60 f, 4-7.
- Wirtanen G., Salo S., (2003). Disinfection in food processing efficacy testing of disinfectants. *Reviews In Environmental Science And Bio-Technology* 2, 293–306.
- Zobell CE., Allen EC. (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surface. *Journal of Bacteriology* 29, 239-251.

Zuliani V., Garry P., (2004). Les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire.
Revue Salles propres 31.

Kadi DIABY

Les biofilms en industrie agroalimentaire : optimisation de leur élimination

Un **biofilm** est constitué d'une ou plusieurs couches de **micro-organismes** protégées par une matrice solide. Il se forme sur les surfaces. En industrie agroalimentaire, la présence de biofilms est problématique car ils risquent de contaminer les aliments qui vont être mis sur le marché. Le biofilm étant englobé par une matrice solide qui le protège des agressions extérieures, est difficile à éliminer. Il est donc important d'avoir un bon plan de **nettoyage** et **désinfection** afin de prévenir la formation de biofilms. Il existe différents **produits nettoyants/désinfectants**. Nous allons voir comment choisir ces produits et s'il y a une bonne méthode de lutte contre les biofilms.

Mots clés : **biofilm, micro-organismes, nettoyage, désinfection, produits nettoyants/désinfectants.**

Biofilm consists of one or several layers of **micro-organisms** protected by a solid matrix. It forms on surfaces. In the agro-food industry, the presence of biofilms is problematic because they may contaminate food that will be placed on the market. The biofilm is surrounded by a solid matrix that protects it from external aggressions, is difficult to eliminate. It is important to have a good **cleaning** and **disinfection** plan to prevent formation of biofilms. There are different **cleaners / disinfectants**. We will see how to choose these products and if there is a good method of fighting against biofilms.

Key words: **biofilm, micro-organisms, cleaning, disinfection, cleaners / disinfectants.**