

Agents chimiques ou naturels : des outils de maîtrise de la contamination microbiologique des surfaces

Chemical or natural tools to control microbiological contamination of surfaces

Par Florence DUBOIS-BRISSONNET⁽¹⁾, Romain BRIANDET⁽¹⁾
et Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE⁽¹⁾
(communication présentée le 16 mars 2006)

RÉSUMÉ

La qualité hygiénique des aliments nécessite une maîtrise de la contamination surfacique des équipements des ateliers de transformation alimentaire. Parfois, les procédures de nettoyage/désinfection s'avèrent limitées et une contamination microbienne subsiste alors sous forme de biofilm. Les micro-organismes contenus dans un biofilm sont généralement moins sensibles aux traitements de désinfection que leurs homologues planctoniques. La présence d'une matrice organique « protectrice » et la physiologie particulière des cellules au sein du biofilm sont fréquemment avancées comme explications à la résistance accrue des biofilms. De nouvelles méthodes curatives se développent actuellement pour limiter la contamination des surfaces utilisant les potentialités bactéricides intéressantes de certains antimicrobiens naturels.

Mots-clés : biofilm, adhésion, biocontamination, désinfectant, antimicrobiens naturels.

SUMMARY

Food safety is dependent on the control of microbiological contamination on equipment surfaces in food processing facilities. Cleaning/disinfection procedures are not always adequate and microbial contamination persists as a biofilm. The microorganisms present in a biofilm are generally less sensitive to disinfection treatments than their planktonic counterparts. The increased resistance of biofilms is frequently attributed to the presence of a "protective" organic matrix and the particular physiology of cells within the biofilm. New curative methods are currently emerging for equipment surface decontamination: for instance, some of these use the interesting bactericidal potential of natural compounds.

Key words: biofilm, adhesion, biocontamination, disinfectant, natural antimicrobial.

(1) UMR ENSIA - INRA 763 « Bioadhésion et Hygiène des Matériaux », 25, avenue de la République, 91744 Massy.

• INTRODUCTION

La sécurité microbiologique des aliments reste un enjeu majeur tant sur le plan de la santé publique que sur le plan économique. En effet, la biocontamination des produits par des micro-organismes pathogènes peut être à l'origine de toxi-infections alimentaires plus ou moins sévères, ces micro-organismes étant capables de survivre dans des conditions particulièrement difficiles (basses températures, pH acides, milieu salin...), de développer des mécanismes d'adaptation aux agressions extérieures rencontrées, d'adhérer puis de coloniser une grande variété de supports récepteurs. Ils peuvent alors être retrouvés sur les sites de production alimentaire, notamment à la surface des équipements ou des matériaux de conditionnement. Les conséquences économiques de tels phénomènes bioadhésifs sont particulièrement importantes, dues notamment aux pertes inhérentes à la dégradation prématurée des produits finis ainsi qu'à l'impact sociétal associé aux toxi-infections. Maîtriser la qualité sanitaire des aliments implique par conséquent de contrôler la contamination microbiologique des surfaces susceptibles d'être en contact avec les denrées fabriquées.

• LES BIOFILMS

Dans la grande majorité des écosystèmes étudiés, le mode de vie planctonique (en suspension) des micro-organismes est très rarement rencontré ou ne constitue qu'un état transitoire, la vie microbienne se déroulant majoritairement sur les surfaces. Il est maintenant estimé que 99 % des microorganismes présents dans les environnements naturels sont fixés à des supports solides (COSTERTON *et al.*, 1987). Ces communautés adhérentes très organisées sont identifiées sous l'appellation de biofilms (figure 1). Ce mode de vie associatif peut être particulièrement bénéfique pour les cellules microbiennes en leur permettant notamment d'assurer leur vie, et surtout leur survie, dans des environnements hostiles ou stressants. Si ces entités communautaires contiennent des germes pathogènes ou d'altération, elles pourront être à l'origine de problèmes économiques, écologiques ou encore de santé publique, plus ou moins sévères.

Malgré des architectures et des organisations variées, on sait aujourd'hui que la formation de ces édifices microbiens répond à un même processus caractérisé par les étapes suivantes (figure 2) :

- **transport** des cellules microbiennes vers la surface du support récepteur. L'adhésion faisant appel à une notion de proximité, les micro-organismes, pour pouvoir adhérer,



Figure 2 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm microbien (BRIANDET et BELLON-FONTAINE, 2001).

doivent venir au voisinage de la surface réceptrice (c'est à dire à quelques dizaines de nanomètres). Ce transport s'effectue par sédimentation, mouvement brownien, forces de gravité, caractéristiques hydrodynamiques du fluide environnant ou encore par un mouvement autonome dans le cas de micro-organismes mobiles (bactéries ciliées ou flagellées) ;

- **adhésion initiale** d'une première couche de micro-organismes par l'intermédiaire d'interactions physico-chimiques entre la surface du micro-organisme et la surface réceptrice (VAN OSS, 1996). Ces mécanismes supposent l'intervention de structures glucidiques, des adhésines, des pilis ou encore des protéines de surface ;
- **consolidation** de la position du micro-organisme sur la surface réceptrice par le biais d'organites extracellulaires et, si les cellules possèdent l'information génétique et le substrat nutritif, par la synthèse de polymères extracellulaires ;
- **colonisation** de la surface par multiplication, co-agrégation cellulaire et, dans certains cas, formation d'une couche muqueuse d'exopolymères microbiens. Outre leur caractère bioadhésif, les exopolymères peuvent également servir de réservoir alimentaire pour les micro-organismes et les protègent contre un grand nombre d'agressions (par exemple, par des désinfectants ou des antibiotiques).

• TRAITEMENT DES SURFACES PAR DES AGENTS CHIMIQUES

Les procédures de nettoyage ne permettant qu'une élimination partielle de la biosalissure, les traitements de désinfection restent nécessaires pour assurer l'hygiène des matériaux. Outre l'utilisation de procédés physiques (UV, traitement thermique...), les agents chimiques sont couramment employés

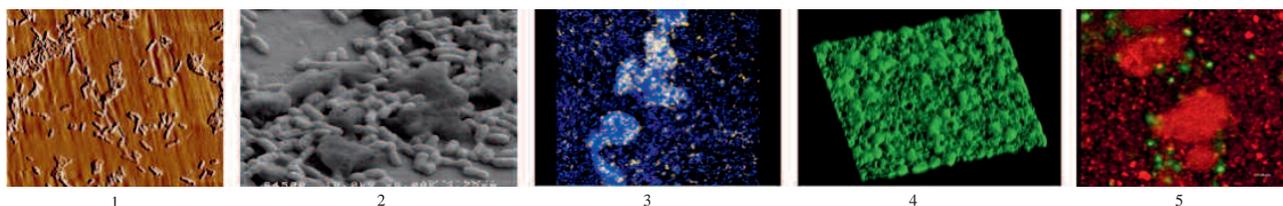


Figure 1 : Biofilms observés en microscopie de force atomique (cliché 1 : observation de cellules adhérentes à l'état natif), microscopie électronique à balayage (cliché 2 : observation d'un biofilm après fixation et déshydratation) et microscopie laser confocale à balayage (clichés 3,4 et 5 : observation de la structure tridimensionnelle des biofilms après marquage par des sondes fluorescentes) (UMR INRA-ENSIA « Bioadhésion et Hygiène des Matériaux »).

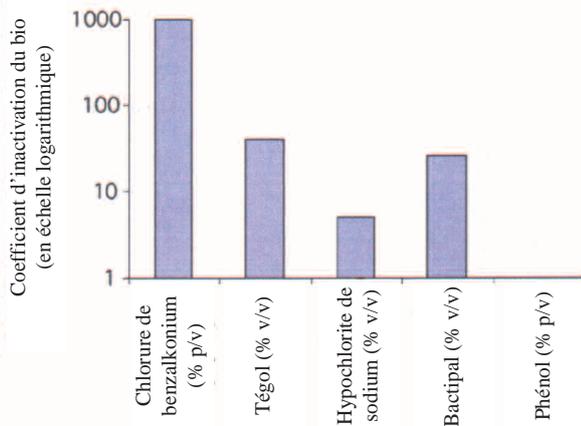


Figure 3 : Coefficient d'inactivation du désinfectant par le biofilm (CMB biofilm / CMB cellules planctoniques) - le biofilm d'*E.coli* est formé sur Tygon (NTSAMA-ESSOMBA et al., 1997). %p/v : pourcentage poids/volume et %v/v : pourcentage volume/volume.

pour la désinfection des surfaces inertes. L'efficacité de ces agents reste toutefois variable d'une application à une autre. En effet, de nombreux auteurs ont observé que les bactéries organisées en biofilm étaient plus résistantes aux produits de désinfection que leurs homologues planctoniques (LECHE-VALLIER, CAWTON et LEE, 1988 ; FRANCK et KOFFI, 1990 ; SURDEAU *et al.*, 2006). Par exemple, NTSAMA-ESSOMBA *et al.* (1997) ont déterminé les coefficients d'inactivation par un biofilm d'*Escherichia coli*, de plusieurs désinfectants de modes d'action différents (figure 3). Le coefficient d'inactivation correspond ici au rapport de la concentration minimale bactéricide (CMB) du biofilm sur celle des cellules planctoniques. Les auteurs constatent que l'activité du chlorure de benzalkonium, composé d'ammonium quaternaire, est très perturbée par la présence du biofilm (coefficient d'inactivation de 1000). L'activité bactéricide des autres composés (dont le Tégol 2000, composé amphotère, l'acide peracétique, et l'eau de javel) est moins perturbée (coefficients d'inactivation respectivement de 40, 25 et 10).

Pour expliquer ces différences de réactivité entre cellules planctoniques et cellules « fixées », différentes hypothèses sont avancées telles qu'un état physiologique spécifique des micro-organismes inclus dans un biofilm, associé ou non à un rôle de barrière diffusionnelle de cette structure vis-à-vis des molécules antimicrobiennes.

Les outils de microscopie par fluorescence permettent d'étudier le rôle de barrière de diffusion des biofilms. Les travaux de GUIOT *et al.* (2002), portant sur les mesures de diffusion de particules inertes dans des biofilms constitués de bactéries modèles non pathogènes, ont permis de mettre en évidence l'implication (i) des interactions stériques (au-delà d'un certain diamètre, les particules ne diffusent plus librement dans le biofilm), (ii) des interactions électrostatiques (immobilisation « instantanée » des particules positivement chargées au contact de cellules microbiennes qui sont, elles, négativement chargées dans les conditions expérimentales testées) et (iii) de l'existence de structures locales dites « en

champignon » (hétérogénéités locales du biofilm d'épaisseur et de densité plus importantes).

Les variations de la physiologie bactérienne, pouvant être la cause de modifications de réponse aux biocides au sein des biofilms, sont engendrées par exemple par des phénomènes de communications inter-cellulaires appelées « quorum sensing » grâce auxquelles les bactéries évaluent leur densité de population, par des taux de croissance ralentis ou par des modifications physico-chimiques de la surface bactérienne (production de composés extra-cellulaires, morphologie, expression génétique...).

Aujourd'hui encore, les tests normalisés utilisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des agents désinfectants restent basés sur l'utilisation de cellules microbiennes en suspension ou déposées et séchées. Ces conditions sont en fait très éloignées de celles généralement rencontrées dans les milieux naturels où, comme nous l'avons dit, les cellules sont généralement adhérentes et souvent incluses dans une matrice polymérique. Ainsi, le manque de connaissances spécifiques des phénomènes de résistance bactérienne conduit parfois à une utilisation des agents désinfectants mal adaptée au problème posé (choix des principes actifs à sélectionner, dosage...).

• TRAITEMENT DES SURFACES PAR DES AGENTS ANTIMICROBIENS NATURELS

Les consommateurs des pays industrialisés souhaitent aujourd'hui disposer de produits non traités contenant peu de conservateurs synthétiques mais dont la qualité sanitaire doit bien sûr être préservée. Pour répondre à cette nouvelle demande sociétale, les industriels se sont tournés vers des antimicrobiens dérivés de plantes, de produits animaux ou encore de micro-organismes. Il pourrait aussi être envisagé dans ce contexte de remplacer, pour les traitements de surface, les désinfectants chimiques par des antimicrobiens alternatifs naturels. Parmi ces antimicrobiens « naturels », se trouvent les composés aromatiques d'huiles essentielles, des acides ou certains sels...

KNOWLES et ROLLER (2001) ont démontré l'efficacité du chitosan et du carvacrol sur différents micro-organismes pathogènes ou d'altération, adhérents sur de l'acier inoxydable. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne de trois composés aromatiques extraits de plantes, le thymol, le carvacrol et l'eugénol, a été testée sur des cellules planctoniques et sur des cellules adhérentes à de l'acier inoxydable (DUBOIS-BRISSONNET, DIETRICH et BELLON-FONTAINE, 2006). Les essais ont été réalisés en utilisant, pour les cellules en suspension, le protocole de la norme européenne EN 1040 et pour les bactéries adhérentes, une adaptation de ce même protocole. Dans le cas du thymol, les bactéries adhérentes sont légèrement plus résistantes ($P < 0,05$) que les bactéries en suspension (figure 4). Pour les deux autres composés, elles ne montrent pas de résistance accrue par rapport à leurs homologues planctoniques. Il faut cependant noter qu'au stade étudié, les bactéries adhérentes ne forment qu'une mono-couche de cellules et qu'il ne s'agit donc pas

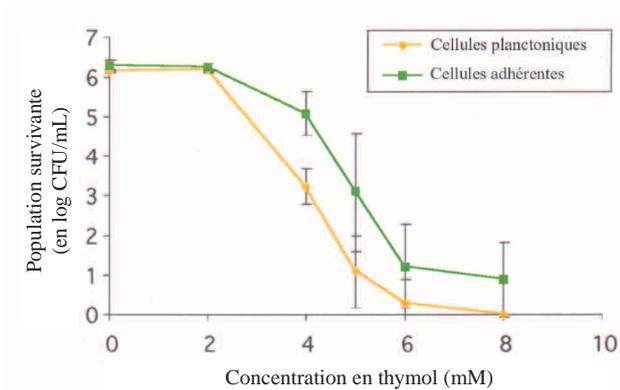


Figure 4 : Survie de Salmonella Typhimurium après 5 minutes de contact avec différentes concentrations de thymol.

de biofilms structurés. De ce fait, les molécules antimicrobiennes n'ont pas eu à franchir de barrière diffusionnelle liée à la présence d'exopolymères.

Les opérations de désinfection par des agents chimiques, classiquement utilisées en fin de procédé, n'ayant qu'une efficacité limitée sur les cellules adhérentes, les molécules naturelles semblent offrir des potentialités susceptibles de venir en appui de ces procédures. De plus, leur utilisation dans un cadre de sécurité des aliments ne peut qu'améliorer l'image que les consommateurs se font des produits industriels !

• CONCLUSION

À l'heure actuelle, malgré les différentes stratégies mises en œuvre, l'élimination systématique des biofilms s'avère difficile du fait de la résistance accrue des cellules fixées et incluses dans une matrice d'exopolymères. Comme nous l'avons vu, les agents naturels semblent offrir des pistes intéressantes comme alternative à la désinfection chimique classiquement utilisée. Une autre voie consiste à agir en amont afin de limiter la biocontamination des surfaces. Des études permettant de modifier les propriétés physico-chimiques des supports pour limiter la fixation des germes indésirables (en favorisant le développement d'interactions physico-chimiques répulsives) commencent à émerger. Les modifications de surface peuvent être obtenues par des traitements physiques (traitement par plasma à arc rampant ; KAMGANG *et al.*, 2005), biochimiques (conditionnement des supports par des biosurfactants ; MEYLHEUC, VAN OSS et BELLON-FONTAINE, 2001 ; ou des protéines) ou biologiques (implantation de biofilms « positifs »). Dans ce dernier cas, outre la modification des propriétés de surface des matériaux, la flore positive peut également avoir un rôle complémentaire en limitant la multiplication des cellules indésirables, jouant ainsi le rôle de flore barrière (concept d'écologie microbienne dirigée) (BRIANDET, 1999).

Cependant, quelle que soit la stratégie choisie (méthode curative ou préventive), les phénomènes mis en jeu sont très complexes et très variables. Cette complexité offre encore aux microbiologistes de nombreuses pistes à explorer.

BIBLIOGRAPHIE

- BRIANDET R (1999). *Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms - Aspects physico-chimiques*. Thèse de doctorat, École Nationale Supérieure d'Agronomie, Rennes.
- BRIANDET R, BELLON-FONTAINE MN (2001) Le biofilm, une stratégie de survie pour les microbes. *Salles Propres*, **9**, 46-56.
- COSTERTON JW, CHENG KJ, GEESEY GG, LADD TI, NICKEL NC, DOSGUPTON M, MARINE IJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 4635-4641.
- DUBOIS-BRISONNET F, DIETRICH C, BELLON-FONTAINE MN (2006) Resistance of planktonic and adherent-cells of *Salmonella* Typhimurium to natural antimicrobials. *Symposium Salmonella and Salmonellosis*. 10-12 may 2006. Saint-Malo (France). sous presse.
- FRANCK JF, KOFFI RA (1990) Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Protec.*, **53**, 550-554.
- GUIOT E, GEORGES P, BRUN A, FONTAINE-AUPART MP, BELLON-FONTAINE MN BRIANDET R (2002) Heterogeneity of the diffusion inside microbial biofilms using fluorescence correlation microscopy under two-photon excitation, *Photochem. Photobiol.*, **75** (6), 570-579.
- KAMGANG J.-O., NAITALI M., HERRY J.-M., BELLON-FONTAINE M.-N., BRISSET J.-L., BRIANDET R. (2005) Effect of non-thermal humid air gliding arc plasma discharge on solid surface physico-chemical properties and consequences on bacterial adhesion and destruction. *Colloque Biofilm 2005*. Arlington (USA).
- KNOWLES J, ROLLER S (2001) Efficacy of chitosan, carvacrol and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *J. Food Protec.*, **64** (10), 1542-1548.
- LECHEVALLIER MW, CAWTHON CD, LEE RG (1988) Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 649-654.
- MEYLHEUC T, VAN OSS C, BELLON-FONTAINE MN (2001) Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 822-832.
- NTSAMA-ESSOMBA C, BOUTTIER S, RAMALDES M, DUBOIS-BRISONNET F, FOURNIAT J (1997) Resistance of *Escherichia coli* growing as biofilms to disinfectants. *Veterinary Research*, **28**, 3-13.
- SURDEAU N, LAURENT-MAQUIN D, BOUTHORS S, GELLE MP (2006) Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, oxsil 320N. *J. Hosp. Infect.*, (sous presse).
- VAN OSS C J (1996) *Forces interfaciales en milieux aqueux*. Paris : Masson.