



HAL
open science

Nettoyage en place des lignes agro-industrielles : Etude Cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires.

Yahaya Sylla

► To cite this version:

Yahaya Sylla. Nettoyage en place des lignes agro-industrielles : Etude Cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires.. Sociologie. AgroParisTech, 2011. Français. NNT : 2011AGPT0074 . pastel-00809268

HAL Id: pastel-00809268

<https://pastel.hal.science/pastel-00809268>

Submitted on 8 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Génie des Procédés.

présentée et soutenue publiquement par

Yahaya SYLLA

le 16 Octobre 2011

Nettoyage en place des lignes agro-industrielles : Etude Cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires.

Directeur de thèse : **Dr Thierry BENEZECH**, Directeur de Recherche INRA, PIHM

Co-encadrement de la thèse : **Dr Christine FAILLE**, Directrice de Recherche INRA, PIHM

Jury

Dr. Francine Fayolle, Professeur, ONIRIS

Dr. John Holah, Head food hygiene department, Campden BRI

Dr. Marie-Laure Lamelloise, Professeur, AgroParisTech,

Dr. Jack Legrand, Professeur GEPEA, Université de Nantes

Dr. Christine FAILLE, Directrice de recherche INRA, PIHM

Dr. Thierry BENEZECH, Directeur de recherche INRA, PIHM

Présidente du jury

Rapporteur / opposant

Examinatrice

Examinateur

Examinatrice

Examinateur

AgroParisTech

Nom de l'Unité de recherche

Adresse de l'Unité de recherche

A ma mère

Tiangué SYLLA et à Feu Mon père Férekaba SYLLA

Remerciements

« La recherche est une école où l'on apprend l'importance du dialogue, de la confrontation des idées, du respect d'autrui (...). La démarche scientifique n'est pas seulement porteuse d'espoir pour la compréhension du monde qui nous entoure (...). Elle apporte aussi à ceux qui la pratiquent un enrichissement intellectuel et moral. » Claude Cohen-Tannoudji

C'est par cette pensée que j'adresse mes remerciements à M. Thierry BENEZOH et Mme Christine FAILLE, Mon directeur et ma co-directrice de thèse pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe afin de réaliser cette thèse. Par leurs conseils, leurs critiques constructifs et leurs soutiens moraux et financiers dans mes moments de difficulté.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à Mme Caroline LE GENTIL, pour m'avoir permis de réaliser mon stage de master au sein du laboratoire, pour sa disponibilité, pour son dynamisme et pour ses sages conseils scientifiques qui m'ont aidé dans la suite des travaux.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble du personnel de l'unité PIHM pour leur esprit d'ouverture, leur enthousiasme et leur disponibilité. Mes remerciements vont tout particulièrement M. Jean-François MIQDAL, Mme Annette RONSE, Jules RONSE, Mme Martine CLARISSE pour leur disponibilité, leur sympathie et leurs conseils.

Mes remerciements s'adressent également à Mr Guillaume DELAPLACE, chargée de recherche pour son soutien et ses conseils.

A tous mes Amis, je ne vous citerai pas tous, car nombreux vous êtes ! Vous qui avez toujours été à mes côtés, vous avec qui j'ai traversé cette période essentielle de ma vie, je vous dis « Anitché » (merci en Dioula)

Mohamed KABA, Moustapha DIABY, Mohamed CISSE, Abdoulaye OUATTARA, Yaba Estelle ADJE, BEN Ibrahim, SIHAME, VIRGINIE, ALEXANDRA, Leonel AKA, Mohamed ZOMBRA, Franc ARMAND, mon cousin Yacoub FOFANA et Tonton Issiaka FOFANA à vous tous, je dis infiniment merci.

Enfin, un infini merci à ma famille, à mon père férékaba SYLLA qui n'est plus de ce monde, mes frères et sœurs qui malgré la distance ont toujours été à mes côtés. Je pense

particulièrement à feu ma grand-mère Naminata SYLLA qui a toujours cru en moi.

Je ne saurai terminer sans remercier tous les POST-DOCS, notamment Yanick LEQUETTE, Vasilis VALDRAMIDIS, Jérémie PETIT et tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé.

A tous ceux qui ne se verront pas cités, cette place vous ai réservé.....

Résumé

Les travaux présentés traitent des cinétiques de décrochement des biofilms bactériens formés au sein des équipements communément utilisés dans les agro-industries. Deux espèces bactériennes *Pseudomonas* et *Bacillus* ayant une forte capacité à former des biofilms dont la présence quasi permanente est reportée dans les industries alimentaires (viande, lait, légumes frais...) ont servi de modèles pertinents pour ces travaux. Par ailleurs *Bacillus*, bactéries potentiellement pathogènes capable de former des spores dont les capacités à adhérer et résister aux environnements chimiques et thermiques défavorables (détergents, traitement de pasteurisation, stérilisation) sont reconnues pour présenter un risque sanitaire majeur pour l'agro-industrie du fait de la contamination des produits alimentaires par l'outil de fabrication lui-même.

Deux types d'études ont été effectués sur le nettoyage d'équipements utilisés en industrie agroalimentaire.

Une première approche cinétique a été mise en œuvre pour étudier l'élimination de ces biofilms des surfaces au cours du nettoyage. Nous avons cherché à identifier les rôles respectifs de l'action mécanique via la contrainte pariétale générée par l'écoulement ou chimique via différentes concentrations en NaOH puis la combinaison des deux actions chimiques et mécaniques. Un modèle biphasique a été proposé pour décrire ces cinétiques de nettoyage en pertinence avec deux phases très distinctes que nous interprétons comme l'élimination de deux fractions différentes du biofilm. Un détachement plus ou moins rapide (1 à 5 min) correspondrait à l'élimination de structures tridimensionnelles composées ou non d'exopolymères suivi par un détachement lent des cellules directement en contact avec les surfaces. Dans le cas des biofilms à *Bacillus*, il existe une fraction du biofilm composée par des spores pouvant représenter près de 90% du biofilm. Cette fraction particulière semble s'éliminer plus rapidement dans la première phase et pas du tout dans la seconde phase. Les données préliminaires sur biofilms mixtes montrent une résistance accrue de l'ensemble qui se traduit par une plus grande résistance de la partie de biofilm constituée par des cellules à *Pseudomonas*.

La seconde thématique développée traite de la possible récontamination par les spores de *Bacillus* décrochées lors du processus de nettoyage.

La réadhésion des bactéries a pu être prouvée par le positionnement des tubes dans le circuit de nettoyage, ainsi que par l'utilisation d'un matériel complexe (vanne bidirectionnelle) communément utilisé dans les agro-industries. Ces travaux ont permis d'identifier les conditions prévalant à cette récontamination. La conception hygiénique des outils de transformation prend tout son sens ici.

Mots-clés : Biofilms, cinétique d'élimination, Nettoyage En Place, hygiène, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus spp*, spores, conception hygiénique

Abstract

This work deals with removal kinetics of bacterial biofilms potentially formed in commonly used equipment in agro-industries. Two bacterial species *Pseudomonas* and *Bacillus* with a strong ability to form biofilms in which the almost permanent presence is reported in the food industry (meat, milk, vegetables...) were chosen as relevant models for the study. Moreover *Bacillus*, potentially pathogenic bacteria can form spores which are known to strongly adhere to solid surfaces and for their ability to withstand adverse environments as thermal and chemical detrimental conditions (detergents, pasteurization or sterilization temperatures). *Bacillus* species are known to pose a major health risk for agro-industry is contamination of food by the technical equipment itself.

Two main areas were considered in the field of food processing equipment cleaning.

At first a kinetic approach was implemented to study the removal of biofilms from surfaces during cleaning operations. Thus respective roles of the mechanical action (wall shear stress under turbulent flow regime), the chemical action (different NaOH concentrations) and the combination of both chemical and mechanical actions were studied. A biphasique model was proposed to describe cleaning kinetics according to the observation of two very different phases which we interpreted as the elimination of two different fractions of the biofilm. A more or less fast detachment in 1 to 5 min would correspond to the three-dimensional elimination of structure with more or less exopolymeric materials followed by a slow detachment of bacteria cells directly in contact with solid surfaces. In the case of *Bacillus*, can represent about 90 % of the total biofilm. Spores removal appeared to be a two phases phenomenon as the whole biofilm. However, the removal was essentially observed during the short first phase of the kinetics. Preliminary data on mixed biofilms with both species *Bacillus* and *Pseudomonas* had shown an increase in their resistance to cleaning comparing to the corresponded monospecies biofilm counterpart. This is really significant for *Pseudomonas*.

The second developed theme considered as a consequence of the above one deals with possible equipment re-contamination by *Bacillus* spores removed during cleaning operations.

Post contamination of food processing equipment during cleaning was thus observed in pipes located at different places in the cleaning loop, as well as in more complex materials as a mixproof valve commonly encountered in Dairies. This work allowed us to identify all the conditions explaining such phenomenon. Equipment hygienic design issues appeared to be here

Keywords: Biofilms, removal kinetics, Cleaning-in-place, hygiene, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sp.*, spores, hygienic design

Listes des Figures

- Figure I. 1.** Schématisation des grands domaines des paramètres régissant l'efficacité du nettoyage des équipements agro-industriels.....9.
- Figure I.2. :** Représentation schématique des énergies libres interfaciales γ_{ij} . Adhésion d'un microorganisme (M) sur la surface du substrat solide (S) dans une suspension liquide (L) (d'après Bos et al., 1999)13.
- Figure I.3.:** Adhésion d'un microorganisme : interaction bactérie-surface support en fonction de leur distance de séparation (Fletcher, 1996).....15.
- Figure I.4. :** Processus régissant la formation de biofilm (Breyers&Ratner, 2004.....19.
- Figure II.1. :** Présentation d'un mécanisme de détachement des cellules individuelles et des amas de cellules de biofilms établis d'après Rupp *et al.* (2005).34.
- Figure II.2. :** Les quatre composantes du nettoyage sous forme d'un cercle partitionné d'après Sinner (1960) et appliqué au nettoyage en place de conduites droites ou présentant des « bras morts » plus ou moins marqués (échanges bon ou mauvais entre le fluide piégé dans le bras mort et le flux principal).....36.
- Figure II.3 :** Différentes formes de courbes d'inactivation : biphasique avec épaulement (a), sigmoïdale (b), convexe (c), linéaire (d), concave (e), biphasique (f), linéaire avec traînée (g)..... 43.
- Figure IV.1 :** Observation en microscopie électronique par transmission des spores de *B. cereus* 98/4 et *B. cereus* 5832 d'après Faille *et al.* (2010)55.
- Figure IV.2:** photographie du tourniqué utilisé pour la formation des biofilms de *P. fluorescens*58.
- Figure IV.3 :** schématisation des coupons en acier inoxydable et présentation des tubes supports.....59.
- Figure IV.4 :** Vanne bidirectionnelle 2 x2 voies.....60.
- Figure IV. 5: 1 :** Photographie de la plate forme expérimentale NEP.....62.
- Figure IV. 5: 2 :** Représentation schématique de la plate forme expérimentale NEP.62.
- Figure V.1 :** Schéma du circuit NEP utilisé pour l'étude de la ré-adhésion bactérienne.69.
- Figure VI-1 :** Evolution du taux de réduction décimale de la population viable et cultivable en fonction de la contrainte de cisaillement.79.
- Figure VI.2 :** Cinétique d'élimination des biofilms de *P. fluorescens* lors des différentes conditions de nettoyage testées80.
- Figure VI. 3 :** Paramètres K_{max1} (s-1) et K_{max2} (s-1) en fonction du débit utilisé. (vert K_{max1} (s-1) et en rouge K_{max2} (s-1)).82.

Figure VI. 4 : Observations au MEB des surfaces de coupons en acier inoxydable après rinçage pour les différents temps indiqués à la contrainte pariétale de 0.144 Pa.....	83.
Figure VI. 5 : Observations en microscopie à épifluorescence des surfaces de coupons en acier inoxydable après rinçage pour les différents temps indiqués à la contrainte pariétale de 0.144 Pa.	84.
Figure VI. 6 : Cinétique d'élimination de l'effet chimique en statique (0,1 ; 0,25 ; 0,45 ; 0,5 et 0,6%) sur des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	87.
Figure VI. 7 : Influence de la concentration de soude sur le paramètre K_{max2} (s-1).....	89.
Figure VI.8 : coloration Live-Dead de biofilm récupérés des tubulures après 5 min de mise en contact avec de la soude pour les concentrations de 0,1, 0,45, 05, et 0,6 %.	90.
Figure VI. 9 : Graphes comparatives des cinétiques réalisées à (0,144 Pa), (0,5% NaOH), (0,144 Pa à 0,144 Pa) et à (1% NaOH à 0,144 Pa)	92.
Figure VII 1. Observation du biofilm de <i>Bacillus</i> à 48h par microscopie en épifluorescence sur des coupons en acier inoxydable (X 100)	94.
Figure VII.2 : Représentation des cinétiques de nettoyage des 4 conditions testées en fonction du temps avec <i>B. sp</i> CCL 9.....	95.
Figure VII.3 : Représentation des cinétiques de nettoyage des 4 conditions testées en fonction du temps avec <i>B. cereus</i> 98/4.....	96.
Figure VII.4 : Représentation des cinétiques de nettoyage des 4 conditions testées en fonction du temps avec <i>B. cereus</i> D 22.....	96.
Figure VII. 5 : Représentation graphique de K_{max1} (s-1) en fonction des conditions testées des trois différentes souches bactériennes.	99.
Figure VII. 6. Représentation sous forme de boîtes à pattes des quantités de cellules viables et cultivables (B) et de la fraction sporulée (S) au sein des biofilms à <i>Bacillus</i> étudiés.....	101.
Figure VII.7 : Représentation des cinétiques de nettoyage de la fraction sporulée des 4 conditions testées en fonction du temps avec <i>B. sp</i> CCL 9.....	102.
Figure VII.8 : Représentation des cinétiques de nettoyage de la fraction sporulée des 4 conditions testées en fonction du temps avec <i>B. cereus</i> D 22.	102.
Figure VII.9 : Représentation des cinétiques de nettoyage de la fraction sporulée des 4 conditions testées en fonction du temps avec <i>B. cereus</i> 98/4.	103.
Figure VII.10 : Photographie MEB de <i>B. cereus</i> 98/4 et <i>B. cereus</i> D 22 après 30 min de trempage dans de la soude.	106.
Figure VII. 11. Observation de la cinétique à 0, 10, 20 et 30 min après 30 min d'action mécanique (X 100)	107.

Figure VII.12 : Cinétique d'élimination du biofilm mixte à <i>P. fluorescens</i> et <i>Bacillus cereus</i> 98/4.....	109.
Figure VIII. 1. Photographie MEB des spores de <i>Bacillus</i> utilisée lors de l'étude.....	113.
Figure VIII.2 : Pourcentage de réduction bactérienne en fonction du temps.....	114.
Figure VIII.3 : Graphe du pourcentage de cellules résiduelles en fonction du positionnement des tubes dans la boucle d'essai.	116.
Figure VIII.4 : Schéma représentant les zones de contamination dans la vanne bidirectionnelle.	119.
Figure A.1 : Suivi de croissances des biofilms des souches bactériennes utilisées lors de l'étude.D.	
Figure 2 : Imagerie MEB et microscopie épifluorescente de l'évolution du biofilm modèle à 24 et 48h de croissance.	F.
Figure 3: Photographie des boudins de gélose avant (gauche) et après (droite) le passage des pistons.	H.

Liste des Tableaux

Tableau I.1. : Paramètres importants liés aux surfaces, à l'environnement et aux cellules bactériennes influençant la formation et le développement du biofilm (Donlan, 2002).....	20.
Tableau II.1 : Espèces microbiennes dans les biofilms de différents environnements industriels agro-alimentaires.....	30.
Tableau II.2. : Températures fréquemment utilisée en nettoyage en fonction des gammes de température dans les industries agro-alimentaires selon Guilbert (1994)	39.
Tableau II.3 : Modèles d'inactivation bactériennes.	45.
Tableau IV.1 : Caractéristique des souches étudiées.....	56.
Tableau VI.4. : Moyennes des paramètres du modèle cinétique utilisé.....	81.
Tableau VI.2. : Valeurs moyennes des paramètres du modèle cinétique identifié.	88.
Tableau VI.3. : Paramètres du modèle diphasique des différentes conditions comparées.....	91.
Tableau VII.1 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec la souche <i>B. Sp</i> CCL 9.	97.
Tableau VII.2 : tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec la souche <i>B. cereus</i> 98/4.....	97.
Tableau VIII.3 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec la souche <i>B. cereus</i> D 22.....	98.
Tableau VII.4 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec les spores de la souche <i>B. sp</i> CCL 9.....	104.
Tableau VII.5 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec les spores de la souche <i>B. cereus</i> D 22.....	104.
Tableau VII.6 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec les spores de la souche <i>B. cereus</i> 98/4.....	105.
Tableau VII.4. Paramètre des cinétiques d'élimination du biofilm mixte à <i>P. fluorescens</i> et <i>Bacillus cereus</i> 98/4.....	110.
Tableau A.1 : Moyenne des résultats de validation du piston dans le décrochement du biofilm.....	G.

Nomenclature

N ou $N(t)$	Quantité de la population survivante au temps t
NEP	Nettoyage En Place
η	viscosité dynamique du fluide (Pa.s).
v_p	Amplitude des pulsations au centre de la conduite ($m\ s^{-1}$)
τ_p	Contrainte du cisaillement d'après l'équation de <i>Blasius</i> (Pa)
τ_w	Contrainte moyenne de cisaillement pariétal (Pa)
D	Durée de réduction décimale (min^{-1})
C_c	Etat physiologique des cellules
EPS	Exopolysaccharides
Re	Nombre de Reynolds $Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D_h}{\eta}$ (adimensionnelle)
α	Paramètre d'échelle de la courbe
β	Paramètre de forme de la courbe
N_{res}	Population résiduelle en fin de traitement
f	Proportion au sein de la population totale de la population majoritaire
N_0	Quantité de la population au début de l'application du stress ($t=0$)
R_a	Rugosité moyenne (μm)
k_2	Taux de destruction
$k_{max\ 2}$	Taux de destruction de la population minoritaire (min^{-1})
$k_{max\ 1}$	Taux de destruction la sous population (min^{-1})
k_{max}	Taux de mortalité bactérienne
ν	Viscosité cinématique ($m^2\ s^{-1}$)
μ	Viscosité dynamique (Pa s)
v	Vitesse moyenne du fluide dans la conduite $v = \frac{Q}{S}$ ($m.s^{-1}$),
VSV	Vortex-sonication-Vortex
$S = \pi a^2$	Section du tube (m^2)

INTRODUCTION	6
Chapitre I : Adhésion bactérienne, formation de biofilm dans les environnements agro-alimentaires et résistance au nettoyage	10
Résumé	11
I.1. Introduction.....	11
I.2. Mécanismes d'adhésion bactérienne à une surface inerte	14
I.3. Les biofilms.....	19
I.3.1. Formation de biofilm.....	20
I.3.1. Variables influençant le développement du biofilm.....	21
I.3.2. Substances polymériques extracellulaire (EPS).....	22
I.3.3. Rôle des EPS dans la consolidation du biofilms bactérien	23
I.3.4. Communication intercellulaire	24
I.3.5. Résistance des bactéries du biofilm aux composés antimicrobiens	25
CHAPITRE II : Nettoyage des équipements en industries agro-alimentaires	27
Résumé	27
II. 1. Introduction	27
II.2. Présence de biofilms bactériens en environnement agroalimentaire et conséquences.	30
II.3. Méthodes d'analyses des biofilms	33
II.4. Nettoyage des souillures dans les industries agroalimentaires	35
II.5. Paramètres influençant l'efficacité du Nettoyage En Place.....	37
II.5.1. Les conditions opératoires du NEP.....	38
II.5.2. Rôles du détergent.....	38
II.5.3. La température de circulation du fluide détergent.....	40
II.5.4. Le temps de circulation du fluide détergent.	41
II.5.5. L'action mécanique.....	41
II.6. Cinétiques de décrochement de bactéries.....	43
CHAPITRE III : Matériaux utilisé en industries agro-alimentaire	48

Résumé :	49
III.1. Introduction.....	49
III.2. Les matériaux en agroalimentaires	50
III.2.1. Acier inoxydable.....	51
III.2.2. Finitions de l'acier inoxydable.....	52
III.3. Propriétés physico-chimiques des matériaux.....	53
III.3.1. L'hydrophobicité :.....	53
III.3.2. Topographie de surface.....	54
III.3.3. Propriétés énergétiques de la surface inerte	56
Chapitre IV : Matériels biologiques et équipements utilisés	58
IV.1. Souches bactériennes.....	58
IV.1.1. Caractéristique des souches étudiées	58
IV.1.2. Préparation de spores	59
IV.1.3. Préparation de la suspension de mère.....	60
IV.1.4. Milieux nutritifs utilisés	60
IV.2. Matériels	60
IV.2.1. Conduites en acier inoxydable.....	60
IV.2.2. Coupons en acier inoxydable.....	61
IV.2.3. Vanne bidirectionnelle 2x2 voies	62
IV.2.4. Le racleur ou piston destiné à récolter les biofilms.....	63
IV.2.5. Agitateur thermo-régulé.	63
IV.2.6. La plate-forme expérimentale et le circuit NEP	64
Chapitre V : Méthode.....	66
Résumé	66
V.1. Cinétique d'élimination des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	66
V.1.1. Phase de contamination des équipements.....	66
Contamination en condition semi-statique.....	66

Formation du biofilm mixte à <i>P. fluorescens</i> et à <i>B. cereus</i> 98/4.....	67
V.1.2. Phase de nettoyage/rinçage du biofilm de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	68
Trempage	68
Nettoyage en conditions statique en présence de soude.	68
Rinçage et nettoyage en conditions dynamiques.....	68
En conditions dynamique avec les coupons (0,144 Pa en tubes carrés)	69
V.2.Cinétique d'élimination des biofilms de <i>Bacillus cereus</i>	70
V.2.1. Phase de contamination des biofilms à <i>B. cereus</i>	70
En condition statique.....	70
V.2.2. Phase de nettoyage du biofilm de <i>Bacillus cereus</i>	70
V.3 Etude de réadhésion bactérienne au cours du NEP	70
V.3.1. Cinétique d'élimination des spores de <i>B. cereus</i>	71
Phase de contamination des spores de <i>B. cereus</i>	71
Phase de nettoyage des équipements	71
V.4. Etude de la redéposition de spores de <i>Bacillus cereus</i> sur un équipement complexe communément utilisé en industrie alimentaire.....	72
V.4.1. Phase de contamination des équipements.....	72
V.4.2. Phase de nettoyage des équipements	72
V.5. Détection de la contamination résiduelle.....	73
V.5.1. Détection par moulage des tubes	73
V.5.2. Détection par raclage de la surface interne des tubes.....	74
V.5.3. Détection par écouvillonnage.....	74
V.5.4. Quantification du pourcentage de spores dans les biofilms.....	75
V.6. Analyse d'images.....	75
V.6.1. Le MEB (microscopie électronique à balayage)	75
V.6.2. La microscopie en fluorescence.....	75

V.7. Analyse statistique	76
V.7.1. Méthodes non paramétriques (le gentil <i>et al.</i> 2009 ; Bénézech <i>et al.</i> , 2001).	76
V.7.2. Méthode paramétrique avec les analyses de variance AVEC SAS	77
V.7.3. Modélisation des cinétiques	77
Chapitre VI : Etude des cinétiques d'élimination des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i>.	78
Résumé	79
VI.1. Choix du modèle cinétique.....	79
VI.2. Etude cinétique en dynamique.....	81
VI.2.1. Taux de réduction décimale de la population initiale.....	81
VI.3. Modélisation des cinétiques d'élimination.....	83
VI.4. Analyse des paramètres du modèle	84
VI.5. Analyse d'image.....	86
VI.6. Etude de l'effet chimique.....	88
Résumé	88
VI.7. Etude comparative de différentes conditions de nettoyage.....	94
Chapitre VII : Etudes des cinétiques d'élimination des biofilms à <i>Bacillus</i>.	96
Résumé	96
VII.1. Analyse des biofilms de <i>B. cereus</i> biofilms	97
VII.2 : Cinétique d'élimination des Biofilms de <i>Bacillus</i>	97
VII.3 : Détermination de la proportion de spores	103
VII.4 : Cinétiques d'élimination de la fraction sporulée.....	104
VII.5 : Cinétiques d'élimination d'un biofilm mixte <i>B. cereus</i> et <i>P. fluorescens</i> : résultats préliminaires	110
Chapitre VIII. Récontamination bactérienne des surfaces des lignes de transformation alimentaire pendant les procédures de Nettoyage En Place.	113
Résumé	113

VIII.1 Contexte.....	113
VIII.2. Etude de la cinétique de détachement des spores de différentes souches de <i>Bacillus</i> ...	114
VIII.3. Étude de la réadhésion.....	117
VIII.4. Analyse et résultats expérimentaux	117
VIII.5. Réadhésion à un équipement complexe : exemple de la vanne bidirectionnelle.....	120
VIII.6. Analyse statistique.....	120
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	124

INTRODUCTION

GENERAL

INTRODUCTION

Chaque année la contamination microbienne coûte à l'industrie alimentaire de nombreux millions de dollar, lié à d'importantes pertes de produits ne répondant pas à l'attente des consommateurs : produits dégradés contenant un nombre inacceptable de contaminants que ce soit en termes de dégradation que de pathogénicité (Brooks & Flint, 2008). Les coûts réels induits par les intoxications alimentaires sont difficiles à déterminer. Toutefois, nous pourrions nous en faire une idée en invoquant certaines études réalisées, par exemple, aux Etats-Unis, en Nouvelle-Zélande et en France.

Aux Etats-Unis, l'incidence et le coût des empoisonnements alimentaires varient considérablement. Ainsi, en 1997 un rapport de la FDA adressé au président américain a révélé qu'il y a eu entre 6,5 et 33 millions de cas par an. Ces empoisonnements avaient causé 9000 décès et coûté 6,5-34,9 milliards de \$ (FDA *et al.*, 1997). En 2000, le coût total des toxi-infections alimentaires (provoquant potentiellement des maladies infectieuses) en Nouvelle-Zélande, un pays qui compte à peine 4 millions d'habitants, a été estimé à 88,8 millions de dollars (Scott *et al.*, 2000). En 2008, 1124 foyers de toxi-infections alimentaires collectives ont été déclarés en France. Elles ont affecté 12 549 personnes, dont 5 cas de décès. Les agents responsables les plus fréquemment incriminés ou suspectés sont l'entérotoxine staphylococcique (32 % des foyers) et les salmonelles (25 % des foyers) (INVS 07/08/09). En dépit des opérations de nettoyage des équipements de transformation des aliments, il est difficile, voire impossible de produire des aliments exempts de micro-organismes, sauf si le processus comprend une étape de stérilisation. Cette difficulté est souvent associée à la présence de biofilms au sein de l'usine.

Plus de 67 ans après les premiers travaux de Zobell, 1943, l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms sont toujours une préoccupation dans de nombreux domaines, et particulièrement dans les domaines alimentaire, agricole et biomédical (Flint *et al.*, 1997; Maukonen *et al.*, 2003; Sihorkar & Vyas, 2001; Veran, 2002; Chen, *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2003; Jessen & Lammert, 2003; Somers et Wong, 2004). Dans les milieux naturels ainsi que dans les filières agroalimentaires, les micro-organismes sont le plus souvent fixés aux surfaces solides en général conditionnées de nutriments en quantité suffisante pour assurer leur viabilité et leur croissance. Ces micro-organismes initialement déposés sur les surfaces, adhèrent et le cas échéant se multiplient activement pour former des colonies de cellules. Cette masse de cellules formée devient de plus en plus importante pour se voir associer

progressivement des débris organiques et inorganiques, des nutriments et d'autres micro-organismes conduisant ainsi à la formation d'un biofilm microbien.

Le terme *biofilm* se réfère à la présence d'une matrice de cellule biologiquement active et de substances extracellulaires en association avec une surface solide (Bakke *et al.*, 1984). Toutefois, selon Costerton *et al.* (1987), un biofilm est un consortium fonctionnel de micro-organismes attaché à une surface et incorporé dans des substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par les microorganismes. À cet égard, la formation de polymères organiques est essentielle et contribue ainsi à une colonisation correcte par les micro-organismes (Allison & Sutherland, 1987). Dans le cas où les biofilms sont une nuisance, le terme encrassement microbien ou bio-adhésion est généralement utilisé. La bio-adhésion s'apparente à la formation indésirable d'une couche de micro-organismes vivants et de leurs produits de décomposition sur les surfaces en contact avec le milieu liquide.

Dans les industries laitières, la bio-adhésion engendre de graves problèmes tels que l'entrave du flux de chaleur au travers des surfaces d'acier (zones de refroidissement par exemple), l'augmentation de la résistance par frottement du liquide à la surface (diminution de l'entrefer) ainsi que l'augmentation du taux de corrosion des surfaces conduisant à des pertes d'énergie, de production et requiert potentiellement de nouveaux investissements.

En outre, les biofilms constitués de flores d'altération ou de pathogènes à la surface des aliments (viande, fromage, légumes frais) et dans l'environnement industriel (ateliers, équipements, bâtiments) peut conduire à une contamination croisée. Diverses études indiquent que le mode de vie des biofilms, leur structure et leur composition conduisent à une augmentation de résistance aux produits antimicrobiens (Langsrud *et al.*, 2003; Simões & Vieira, 2009; Simões *et al.*, 2006). Les biofilms sont plus résistants aux agents antimicrobiens que les cellules planctoniques. Cette plus grande capacité de résister rend leur élimination plus délicate. Ainsi le nettoyage des installations en industries alimentaires demeure un grand défi, voire même une nécessité quant à une meilleure hygiène en agro et en bio-industries (Simões & Vieira, 2009; Simões *et al.*, 2006).

De plus, l'émergence de bactéries résistantes aux agents antimicrobiens conventionnels montre clairement que de nouvelles stratégies de contrôle des biofilms sont nécessaires (Sidhu *et al.*, 2006 ; Simões *et al.*, 2006).

Diverses techniques ont été adoptées pour comprendre les mécanismes conduisant au développement et au maintien des biofilms dans les milieux industriels. Ainsi, de nombreuses stratégies de préventions et de contrôles ont été mises œuvre en pour les

éliminer. En attestent la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène, la conception hygiénique des équipements au travers de choix des matériaux et des formes, la sélection des détergents et des désinfectants et des procédures d'hygiène adéquates.

Les procédures de nettoyage systématiques ne sont pas indiquées dans certaines pratiques industrielles. Elles sont en effet néfastes à la transformation des produits. C'est par exemple le cas des hâloirs de maturation des fromageries. La stratégie adoptée est alors ce que l'on appelle depuis plus de 20 ans l'écologie microbienne dirigées (Carpentier & Cerf (1993).

Pour apporter notre contribution à ces différentes études, nous nous sommes fixé pour objectif de former des biofilms modèles reproductibles et répétables constitués de bactéries pathogènes et d'altérations et d'étudier la résistance des structures formées au cours de nettoyage des installations fermées dans les industries agro-alimentaires. L'objectif visé dans cette première étude est d'identifier et de modéliser les cinétiques d'élimination de biofilms bactériens mono (essentiellement) ou multi-espèces lors du nettoyage en places (NEP) d'équipements industriels et de caractériser une conséquence des ces opérations de NEP dans le cas de contamination microbiennes des surfaces qu'est la contamination des installations lors des opérations d'hygiène.

Pour mener à bien notre étude, deux espèces bactériennes ont été choisies, une d'altération avec *Pseudomonas fluorescens* (non-pathogène) et la seconde avec *Bacillus cereus* (pathogène). Des cinétiques de nettoyages ou de contamination le cas échéant ont été menées afin de déterminer les paramètres clés au travers d'observations des mécanismes intrinsèques et de proposer un modèle.

Le second objectif visé dans ces travaux était d'étudier le phénomène de récontamination des surfaces qui se produit lors du processus de nettoyage en place des installations dans les systèmes fermés.

ETAT DE L'ART

Chapitre I : Adhésion bactérienne, formation de biofilm dans les environnements agro-alimentaires et résistance au nettoyage

Résumé

Ce chapitre introductif a pour but de présenter, une mise au point bibliographique sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms. Dans une première partie, les différents facteurs qui influencent l'adhésion bactérienne à la surface des équipements industriels, ainsi que les différentes interactions qui peuvent exister entre une bactérie et un support solide seront présentés. L'objectif visé dans cet état de l'art est de montrer la complexité du phénomène d'adhésion et des différentes composantes qui peuvent intervenir dans la formation des liaisons bactérie-paroi point de départ des structures bactériennes complexes appelées « biofilms ». La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à la résistance des biofilms aux composés antimicrobiens.

I.1. Introduction

Les entreprises de transformations alimentaires doivent très régulièrement nettoyer leurs installations afin de maintenir la fonctionnalité des équipements et des machines et d'assurer la sécurité sanitaire de leurs produits. Il s'agit ici de réduire le risque de contamination des produits en particulier par des pathogènes, à un niveau acceptable. Un risque nul n'est malheureusement pas envisageable. En effet les procédures d'hygiène se révèlent parfois inefficaces.

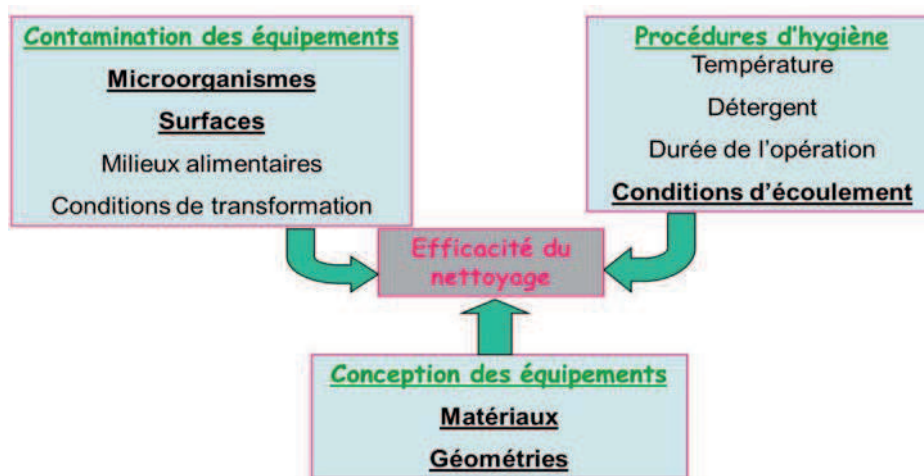


Figure I.1. : Schématisation des grands domaines des paramètres régissant l'efficacité du nettoyage des équipements agro-industriels.

L'aptitude au nettoyage des équipements et des installations industrielles dépend de trois ensembles de facteurs comme le montre le schéma présenté en figure 1 (Lelièvre C., 2001).

Nous avons :

- les conditions environnementales qui président à la formation du dépôt et va conduire à générer des structures aux propriétés adhésives liées à la transformation de l'aliment, favoriser le transport de microorganismes près des parois et donc leur adhésion,
- la conception des systèmes de production à savoir le choix des matériaux, le choix de la géométrie des équipements et de leurs assemblages pour former la ligne de transformation,
- les procédures d'hygiène *sensu stricto*, comprenant le choix des temps, des détergents et désinfectants et de l'importance de l'action mécanique liée aux écoulements de fluides nettoyants.

Nous allons nous intéresser dans un premier temps aux matières encrassantes et aux conséquences sur l'adhésion aux surfaces solides.

D'après Epstein (1981), différents types d'encrassement peuvent être décrits. Nous avons : l'encrassement particulaire dû à une sédimentation, l'encrassement dû à la solidification d'un composé liquide sur une surface (procédés de transformation du type congélation), l'encrassement dû a une réaction chimique sur une surface support, l'encrassement corrosif dû à une réaction du support, l'encrassement par précipitation d'un composé et l'encrassement biologique comprenant des microorganismes, des matières organiques et des minéraux.

Beaucoup de travaux ont été réalisé sur la formation de ces dépôts (Wakinson *et al.*, 2004, Wilson *et al.*, 1999, 2002, Faille *et al.*, 2000). Beaucoup d'efforts ont été fait ces 30 dernières années pour maîtriser voire réduire cet encrassement des surfaces des équipements et des ateliers. Nous nous proposons de nous focaliser sur l'encrassement biologique qui, à lui seul, a été particulièrement étudié car il concerne non seulement plusieurs secteurs industriels (agro-alimentaire, biotechnologie, cosmétique, pharmacie, nucléaire) mais également le domaine hospitalier pour ne citer que les exemples les plus marquants.

L'encrassement par la formation de dépôt sur la surface des équipements, quand il est suffisamment épais (de l'ordre du mm) comme dans le cas de l'encrassement laitier

(Delaplace *et al.*, 1995), influence clairement les performances d'une unité de transformation en diminuant par exemple le transfert de chaleur. Le nettoyage permet en général d'éliminer de tels dépôts, mais la présence de résidus après nettoyage constitue une source de nutriment pour les microorganismes qui peuvent avoir suffisamment de temps pour se développer et remettre en cause le bon état sanitaire de produits lors de leur transformation suivante. L'adsorption sur les surfaces solides de souillures organiques et minérales générées par le contact de l'aliment au cours de sa transformation dans les industries alimentaires participe très largement au risque d'adhésion et de développement de souillures microbiennes et a fortiori si cette contamination n'est pas éliminée par les cycles de nettoyage et de désinfection, qui y trouvent une source de nutriments. Un exemple très largement étudié est l'encrassement laitier pour la diminution très significative des performances des échangeurs destinés à traiter thermiquement ces produits (Delaplace *et al.*, 1995). L'étude du nettoyage a fait l'objet de relativement peu de travaux par comparaison aux travaux sur l'encrassement des surfaces (Lalande & Tissier, 1982, Perlat *et al.*, 1994). Par ailleurs, les souillures impliquant des microorganismes sont le plus souvent microscopiques en industries alimentaires, on est loin heureusement des conditions rencontrées dans les réseaux de distribution d'eau, ou encore dans les systèmes de refroidissement à eau circulante où l'on peut trouver des dépôts de taille millimétrique. Cette importance relative, ne présente pas moins des risques potentiellement importants dus à la présence possible de microorganismes pathogènes.

La première étude réalisée sur l'adhésion des microorganismes aux surfaces fut celle de ZoBell (1943) dans laquelle il décrit l'adhésion des bactéries marines aux surfaces submergées. Dans cette étude, il a observé que l'adhésion des bactéries était dépendante du temps, montrant ainsi que la boue observée sur la surface a augmenté avec le temps. Depuis cette époque, l'adhésion bactérienne dans le milieu marin a été largement étudiée en particulier l'encrassement des coques des navires se traduisant par un frottement plus important avec l'eau et augmente de façon très significative la quantité de carburant nécessaire pour déplacer les bateaux.

Le phénomène d'adhésion bactérienne a été étudié dans de nombreux domaines où la présence de micro-organismes adhérents a un impact négatif. Ces domaines comprennent la formation de la carie dentaire (Gibbons & Van Houte, 1980), la colonisation des implants médicaux (Dankert *et al.*, 1986), la formation de biofilm dans les conduites d'eau de boisson (LeChevallier *et al.*, 1987) et dans les environnements de traitement des denrées alimentaires (Holah *et al.*, 1989).

Avant les années 1980, les informations concernant l'adhésion bactérienne conduisant à la formation de biofilms était relativement parcellaire. Aujourd'hui la preuve de la participation des biofilms dans la contamination des aliments par les équipements de transformation est avérée. Les dangers dus à la présence des bactéries dans l'environnement alimentaire incluent : l'accumulation du biofilm sur les surfaces des aliments, la colonisation microbienne dans les réservoirs de stockage de lait, l'encrassement des échangeurs de chaleur et enfin l'adhésion de spores sur les emballages et les surfaces de matériau (Kirtley & McGuire, 1989).

I.2. Mécanismes d'adhésion bactérienne à une surface inerte

Le développement d'un encrassement micro ou macroscopique peut être perçu comme une série d'étapes successives. L'étape initiale d'adhésion est considérée comme essentielle (Oliveira, 1997). L'adhésion faisant appel à une notion de proximité, les micro-organismes doivent tout d'abord arriver au voisinage de la surface (quelques dizaines de nanomètres). Fletcher (1996) rappelle qu'au sein d'une population bactérienne en suspension, seule une très faible proportion adhère à un support immergé. Par exemple, pour des essais réalisés au laboratoire dans des conditions statiques, seul un centième des spores de *Bacillus cereus* en suspension va adhérer aux supports (Faille *et al.*, 1999).

Dans la littérature, certains chercheurs ont tenté de décrire le processus d'adhésion de manière rationnelle en utilisant des principes de la physique et de la chimie. Le processus d'adhésion a été décrit principalement via la théorie des systèmes colloïdaux. Bien que dans certains cas, les bactéries se comportent comme de petites particules, elles demeurent des organismes vivants, dont la forme et les propriétés de surfaces sont a priori complexes. Les vraies particules colloïdales se déplacent grâce à l'application de forces externes. Cela n'est pas nécessairement le cas pour les bactéries, car certaines d'une manière générale, l'énergie de surface est la propriété physico-chimique la plus importante d'une surface solide. Quand une surface est mise en contact direct avec une solution, les molécules et les atomes de cette surface interagissent avec les molécules et les atomes contenus dans la solution et le type des forces, ou d'interactions, dépend de la composition chimique des deux milieux. D'après Asther *et al.* (1990), l'adhésion des micro-organismes sur des surfaces chimiquement inertes relève de la physico-chimie et peut être prévu par des modèles thermodynamiques.

La première théorie qui a été utilisée pour expliquer l'interaction entre micro-organismes et surface d'adhésion est la théorie DLVO, qui doit son nom au quatre scientifiques qui l'ont développée (Derjaguin & Landau, 1941 ; Verwey & Overbeek, 1948).

Dans cette approche, l'adhésion microbienne est décrite comme un équilibre entre l'attraction des forces de van der Waals et la répulsion ou l'attraction des forces électrostatiques. L'introduction de l'interaction électrostatique exige que le potentiel Zêta de la surface interactive soit également mesuré en plus de l'angle de contact.

Plus récemment, Van Oss (1994) a proposé une extension de la théorie DLVO. Ainsi, aux forces de Lifshitz-van der Waals (LW) et électrostatiques (EL) s'ajoute la composante acide-base de Lewis (AB) et le mouvement Brownien (Br).

L'énergie totale d'interaction, ΔE^{TOT} , entre une particule et une surface solide peut être écrite comme la somme de ces différents termes :

$$\Delta E^{TOT} = \Delta E^{LW} + \Delta E^{EL} + \Delta E^{AB} + \Delta E^{Br} \quad (I.1)$$

Oliveira (1997) et Azeredo *et al.* (1999) ont montré que l'équilibre entre toutes les interactions possibles détermine si les particules adhèrent ou non à une surface. D'après ces auteurs, l'adhésion a lieu lorsque la valeur de ΔE^{TOT} est négative (le total des forces interactives est attractif).

L'approche thermodynamique de l'adhésion est basée sur la mesure des angles de contact entre les surfaces qui interagissent et la comparaison des énergies libres interfaciales entre les bactéries en suspension et celles adhérant à un support.

La figure 1 montre les différentes énergies libres interfaciales qui interviennent dans l'interaction entre une bactérie (M), un support (S) et un milieu liquide (L).

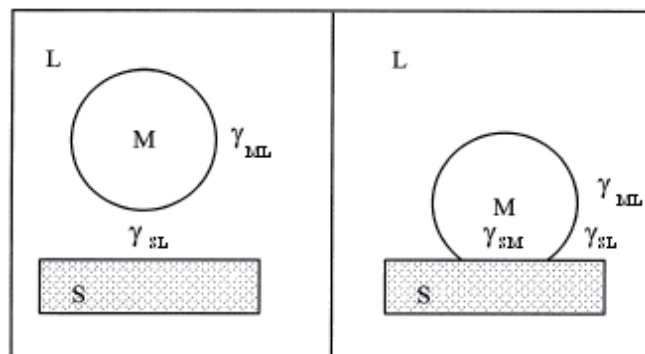


Figure I.2. : Représentation schématique des énergies libres interfaciales γ_{ij} . Adhésion d'un microorganisme (M) sur la surface du substrat solide (S) dans une suspension liquide (L) (d'après Bos *et al.*, 1999).

Plusieurs études sur des surfaces polymériques ou du verre ont montré qu'il existe une relation entre le nombre de microorganismes adhérents et l'énergie de surface du support d'adhésion (Van Pelt *et al.*, 1985). De ce fait, la détermination de l'énergie de surface d'un support d'adhésion donne directement une idée sur les forces attractives interfaciales. C'est pourquoi Fletcher (1991) et plus récemment Liu & Zhao (2005) proposent de modifier l'énergie de surface des équipements industriels afin de minimiser l'adhésion bactérienne. D'autres travaux ont été menés sur l'adhésion bactérienne pour des surfaces présentant différents niveaux énergétiques. Toutefois, l'effet de ces niveaux énergétiques demeure ambigu sur les mécanismes d'adhésion. En effet, certaines études ont montré que l'adhésion des bactéries tend à décroître lors de la diminution de l'énergie de surface des substrats (Dexter, 1979 ; Hamza *et al.*, 1997 ; Bakker *et al.*, 2003). Mais des effets contraires ont été observés avec une diminution significative de l'adhésion bactérienne lorsque l'énergie de surface du substrat augmente (Jonsson & Jonsson, 1991 ; Brink *et al.*, 1993).

D'après Liu & Zhao (2005), l'adhésion bactérienne peut diminuer ou augmenter avec l'augmentation de l'énergie de surface des substrats. Ce facteur dépend en grande partie des propriétés physiques et chimiques de la bactérie, des substrats et de la solution aqueuse. Au cours de leurs travaux, ces auteurs ont montré que le nombre de bactéries attachées à une surface décroît avec la diminution de l'énergie de surface ou l'augmentation de l'énergie totale d'interaction. La valeur de cette énergie augmente lorsqu'il y a diminution de l'énergie de surface du substrat.

Selon Marshall (1992), l'adhésion des bactéries se déroule en trois étapes :

- Transport de la bactérie au voisinage de la surface ;
- Adhésion réversible : les bactéries peuvent adhérer aux surfaces mais elles peuvent aussi être facilement désorbées du support ;
- Adhésion irréversible ou attachement.

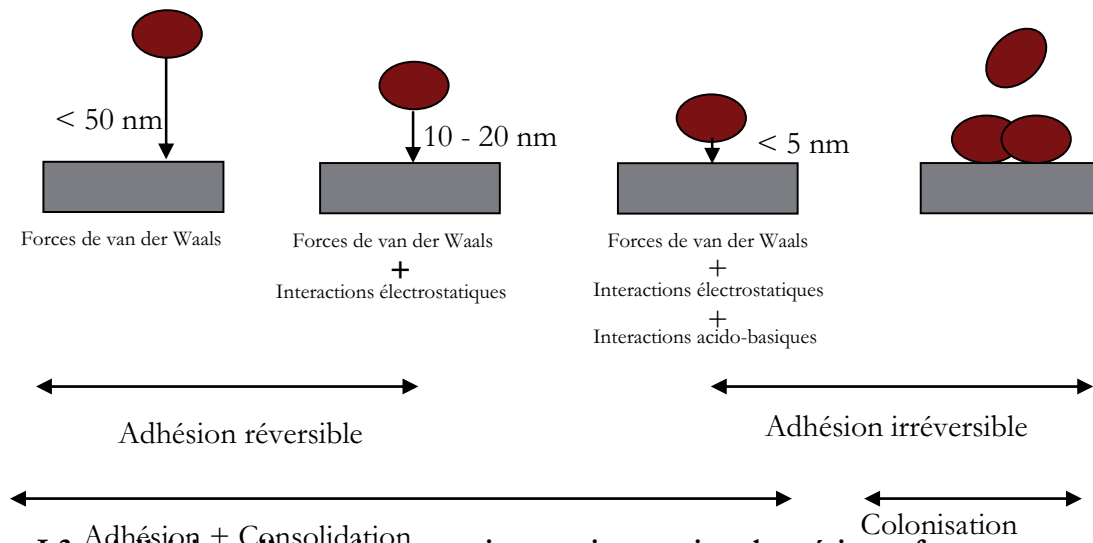


Figure I.3.: Adhésion d'un microorganisme : interaction bactérie-surface support en fonction de leur distance de séparation (Fletcher, 1996).

Les interactions de van Der Waals dites longues distances vont d'abord intervenir et sont réversibles. Puis, quand la distance est inférieure à 20 nm, les interactions électrostatiques viennent s'ajouter et enfin lorsque la distance est inférieure à 10 nm, interviennent les interactions acido-basiques et les interactions secondaires dites irréversibles. Puis, si la croissance est initiée, il va y avoir colonisation de la surface par formation de micro colonies intégrées dans la matrice d'exopolysaccharides et développement d'un biofilm. Il est cependant très difficile de déterminer laquelle de ces forces ou interactions est la plus importante dans l'adhésion. Mc-Eldowney & Fletcher (1986) ont tenté de déterminer qui des interactions électrostatiques et des interactions hydrophobes était le plus important dans l'adhésion. Ils ont pour cela ajusté l'électrolyte d'une suspension par ajout de diméthyle sulfoxyde (DMSO), un agent actif de surface. Ainsi ils ont montré que les interactions électrostatiques et hydrophobes jouaient un rôle dans l'adhésion, mais ils n'ont pas pu expliquer intégralement les données obtenues. En outre, ils ont noté que l'adhésion variait considérablement avec les espèces et les conditions d'incubation.

La fixation initiale via les forces de faible énergie comme les interactions électrostatiques et la force de Van der Waals se produit rapidement, mais, dans ce bref délai l'expression génétique est modifiée induisant la croissance du biofilm après la fixation physique des cellules à la surface puis l'excrétion de complexes de polysaccharides qui vont participer aux forces de cohésions au sein du biofilm en construction (Zottola, 1994 ; Palmer *et al.*, 2007).

Il a été suggéré par (Kirtley & McGuire, 1989) qu'un film de conditionnement macromoléculaire doit être formé sur une surface avant que l'adhésion microbienne ne puisse se produire et que tous les événements d'adsorptions ultérieures sont observées et dépendent de l'état de conformation de ce film de conditionnement. Toutefois, il a été démontré que l'adhésion de Streptocoques thermoduriques et leurs cellules végétatives et des spores de *Bacillus* thermophiles sur l'acier inoxydable se font en l'absence de film de conditionnement (Flint, 1998 ; Flint *et al.*, 2001). Par ailleurs, les conditions environnementales vont pouvoir favoriser ou non la mise en œuvre de ces forces et interactions. Par exemple, l'augmentation de la vitesse d'écoulement du fluide ou de la concentration d'éléments nutritifs peut également impacter sur l'augmentation de l'adhésion, si ces facteurs ne dépassent pas les niveaux critiques (Simoes *et al.*, 2007; Stoodley *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 1993).

Dans la littérature, il est établi que les propriétés de surface des bactéries peuvent influencer leur adhésion à la surface des matériaux. D'après Rönner *et al.*, (1990), les procédés de nettoyage classique ne permettent d'éliminer que 40% des spores. Cela est dû à la capacité des bactéries à adhérer fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable. Ils ont aussi montré dans cette étude que des spores de *Bacillus cereus*, considérées comme «hydrophobes» peuvent adhérer 2,5 fois plus que des spores de *Bacillus licheniformis* moins «hydrophobes» sur une surface de verre elle-même «hydrophobe». Plusieurs études ont mis en évidence cette propriété en utilisant des méthodes différentes telles que l'affinité pour l'hexadécane (Doyle *et al.*, 1984 ; Wiencek *et al.*, 1990), la chromatographie d'interaction hydrophobe (Simmonds *et al.*, 2003) ou encore la mesure d'angle de contact. Ce caractère hydrophobe marqué, souvent attribué à l'abondance de protéine de surface (Doyle *et al.*, 1984) est fréquemment cité à l'origine de la forte capacité d'adhésion des spores (Rönner *et al.*, 1990 ; Husmark & Rönner, 1993 ; Faille *et al.*, 2000). L'hydrophobicité de la surface de la cellule est importante dans la fixation car les interactions hydrophobes ont tendance à augmenter avec le caractère non polaire de l'une ou de deux surfaces concernées (Donlan, 2002). Selon Drenkard & Ausubel. (2002), la capacité des bactéries à s'associer les unes aux autres et à des surfaces biotiques ou abiotiques dépend en partie de la capacité à générer des interactions hydrophobes.

De nombreuses cellules produisent des appendices filamenteux extracellulaires. Par conséquent, leur rôle potentiel dans le processus d'adhésion a souvent été suspecté. De fait, le rayon d'interaction avec la surface est bien supérieur à celles des cellules elles-mêmes. Un certain nombre de structures de formation sont connus : flagelle, pili ou fibrille, etc ...

(Harbron & Kent., 1988). L'existence de flagelles chez des bactéries est responsable de leur motilité. Ce sont des filaments très fins de protéines de flagellines avec une structure hélicoïdale allant au cytoplasme via la paroi. Le flagelle peut avoir un diamètre compris entre 0,01 et 0,02 μm , et une longueur de 10 μm . De nombreux types de bactéries ont des flagelles, y compris le genre *Pseudomonas*. Il est possible que le flagelle lui-même puisse former une liaison avec la surface du substrat (Harbron & Kent, 1988). La fonction principale du flagelle dans la formation du biofilm est supposée être le transport et l'interaction initiale cellules-surfaces (Sauer & Camper, 2001). Le rôle du flagelle dans la motilité est de surmonter les forces répulsives à la surface du substrat et, par conséquent, la formation d'une monocouche de cellules sur la surface d'adhésion (Daniels *et al.*, 2004). Les pili ou fibrilles sont présent à la surface des nombreuses bactéries Gram(-), y compris les espèces de *Pseudomonas*. Ce sont de fins appendices filamenteux, composés également de protéines, de 4 à 35 nm de largeur et ayant plusieurs micromètres de long (Harbron & Kent, 1988). Ces structures sont généralement droites et ne sont pas impliquée dans la motilité. Leur seule fonction générale connue est de rendre les cellules plus adhérentes. Les bactéries possédant des pili peuvent adhérer fortement à d'autres cellules bactériennes et d'autres particules inorganiques (Harbron & Kent, 1988). Néanmoins, ils ne sont pas toujours impliqués dans le processus d'adhésion, même s'ils sont présents (Characklis & Cooksey, 1983). Selon Sauer & camper (2001), pili et structures associées aux pili sont importants dans l'adhésion et dans la colonisation des surfaces. Ces structures aident à surmonter la barrière initiale de répulsion électrostatique qui existe entre la cellule et le substrat. Les *prosthecae* et les tiges forment le troisième groupe de la structure d'adhésion. Elles se produisent dans plusieurs types de micro-organismes. Elles peuvent se produire à un ou plusieurs sites sur la surface de la cellule et de la paroi de la cellule. Ces structures sont filiformes (communément de 0,2 μm) et sont présents à la surface de la membrane (Harbron & Kent, 1988). À la fin des prosthecae ou des tiges est généralement observé un disque adhésif. La structure de tige ou de cale est très souvent utilisée par les diatomées pour s'attacher à une surface (Harbron & Kent, 1988).

I.3. Les biofilms

Selon Costerton *et al.* (1987) un biofilm est un consortium fonctionnel de micro-organismes attaché à une surface et incorporé dans des substances polymériques

extracellulaires (EPS) produites par les microorganismes. La formation du biofilm, comme nous l'avons précédemment évoqué, constitue une étape consécutive à l'adhésion bactérienne.

Depuis l'époque de Louis Pasteur, les microbiologistes ont étudié des cultures pures de micro-organismes, le plus souvent en suspension dans des bouillons nutritifs. Aujourd'hui tous s'accordent sur le fait que les bactéries se développent de préférence à la surface de supports et principalement au sein de biofilms. L'épaisseur du biofilm peut varier de quelques micromètres à plusieurs millimètres et contenir 90–97 % d'eau. Dans les biofilms d'espèces mixtes, les cellules bactériennes peuvent être accompagnées par des eucaryotes, une variété de polysaccharides extracellulaires (EPS), d'enzymes et autres protéines, de bactériocines et de faibles solutés de masse, ainsi que des acides nucléiques qui peuvent être présents à la suite de la lyse des cellules (Sutherland *et al.*, 2004). Des biofilms d'espèces mixtes peuvent être plus stables que des biofilms mono espèces (Mosteller & Bishop, 1993) et cela peut être important dans des situations telles la surface de végétaux que l'on retrouve dans les produits de quatrième gamme, où de nombreuses espèces sont potentiellement présentes.

I.3.1. Formation de biofilm

La formation de biofilm est un processus relativement lent et peut atteindre le millimètre d'épaisseur en quelques jours en fonction des conditions de culture (Melo *et al.*, 1992). Les micro-organismes dans un biofilm ne sont pas uniformément distribués. Ils poussent sous forme de micro colonies emprisonnées dans une matrice intercalés de canaux très perméable à l'eau (Costerton *et al.*, 1994a). La composition d'un biofilm peut être hétérogène, en raison de la colonisation par différents micro-organismes possédant différents besoins nutritionnels. Les biofilms n'existent pas nécessairement sous forme de couche uniforme sur l'ensemble de la surface du substrat. L'augmentation de la taille d'un biofilm est favorisée par le dépôt ou par la fixation d'autres solutés organiques et inorganiques et de particules présentes dans la phase liquide environnante (Melo *et al.*, 1992).

Il existe un certain nombre de mécanismes par lesquels bon nombre d'espèces microbiennes peuvent entrer en contact de façon étroite avec une surface, s'attacher fermement, promouvoir les interactions intercellulaires et croître sous forme de structures complexes. La formation de biofilm comprend différentes étapes et le mécanisme de formation des biofilms a été largement décrits par plusieurs chercheurs dans des études récentes (Breyers & Ratner, 2004 ; Chmielewski & Frank, 2003 ; Donlan &

Costerton, 2002 ; Hall-Stoodley & Stoodley, 2002; O'Toole *et al.*, 2000 ; Verstraeten *et al.*, 2008). Les processus identifiés régissant la formation des biofilms sont présentés dans la figure 3 d'après Breyers& Ratner (2004). Nous pouvons citer les étapes suivantes après l'adhésion :

- v. la production de molécules de signalisation intercellulaire;
- vi. le transport de substrats dans le biofilm;
- vii. Le métabolisme du substrat par les cellules liées du biofilm et le transport des produits du biofilm. Ce processus (métabolisme du substrat et transport des produits) est accompagné de la croissance des cellules et la production d'EPS;
- viii. l'élimination des parties du biofilm par détachement ou desquamation.

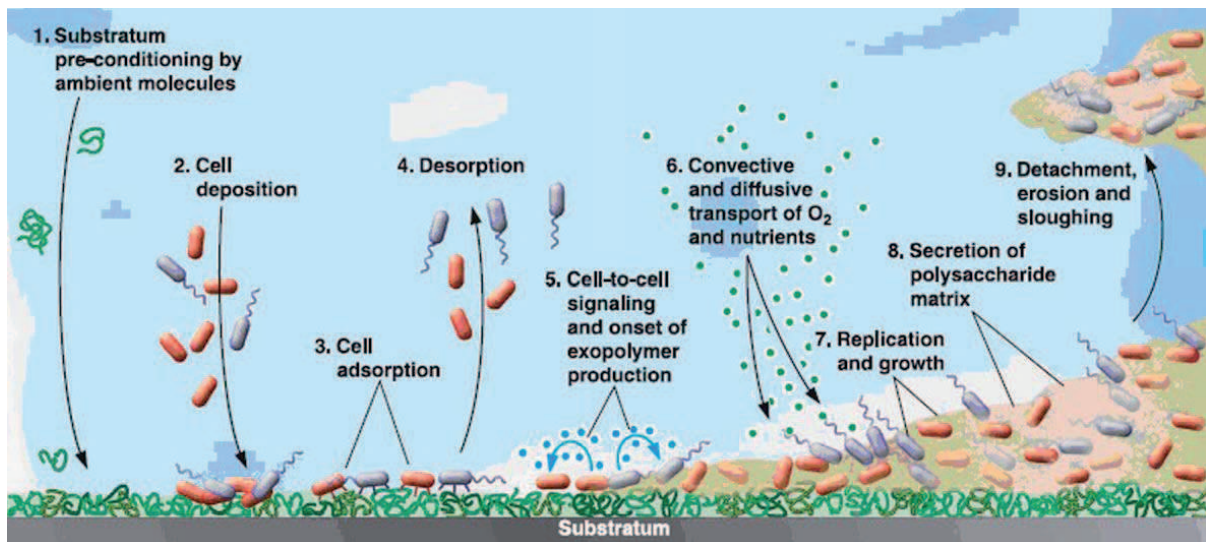


Figure I.4. : Processus régissant la formation de biofilm (Breyers&Ratner, 2004).

I.3.1. Variables influençant le développement du biofilm

D'après Jefferson (2004) la formation de biofilms permet aux microorganismes de se défendre contre les conditions difficiles via une colonisation de niches favorables assurant protection et nutriments. Ainsi, les avantages pour un microorganisme de la vie au sein d'un biofilm sont :

Protection et défense : réduction des effets de la turbulence (Sutherland, 2001); réduction des agressions environnementales liées à la présence de molécules destinées à détruire les cellules comme les antibiotiques ou les désinfectants mais aussi contre les substances nettoyantes destinées à fragiliser, découper... et éliminer les biofilms des surfaces (Costerton *et al.*, 1985 ; Nichols, 1989) ;

Colonisation : par réduction de la diffusion d'exo-enzymes (Sutherland, 2001) et l'augmentation de la concentration d'éléments nutritifs (Van Loosdrecht *et al.*, 1990) ;

Communauté : la possibilité d'organisations optimales grâce au transfert de signaux entre cellules destinée à faire circuler de « l'information génétique » comme les gènes de résistance (Morton & Gaylarde, 2001)

La dynamique de formation et de développement de biofilms facilite la transmission d'agents pathogènes en leur fournissant un environnement protecteur stable. Le biofilm agit comme une source de diffusion d'un grand nombre de micro-organismes dans l'environnement. Des amas du biofilm ou « clusters » par exemple, sont détachés soit par action mécanique liée à l'écoulement (Hall-Stoodley & Stoodley, 2005) d'un fluide soit naturellement (sloughing) et ainsi dispersés dans l'environnement.

Tableau I.1. : Paramètres importants liés aux surfaces, à l'environnement et aux cellules bactériennes influençant la formation et le développement du biofilm (Donlan, 2002).

Surfaces	Fluide	Cellules
Texture ou rugosité	Vitesse du fluide	Hydrophobicité de la surface des cellules
Hydrophobicité	pH	Appendices extracellulaires
Chimie de surface	Température	substances extracellulaires polymériques
Charge	Cations	Molécules de signalisation
Film de conditionnement	Présence de produits antimicrobiens	
	Disponibilité des éléments nutritifs	

Les paramètres biologiques qui réglementent la formation du biofilm, visés dans Tableau 1, sont brièvement décrits dans les sections suivantes.

I.3.2. Substances polymériques extracellulaire (EPS)

La plupart des bactéries produisent des substances polymériques extracellulaires (EPS) d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens (Geesey

GG. 1982). La production de substances exopolymériques n'est possible que si la croissance bactérienne se fait dans une suspension de culture ou dans le biofilm. Le biofilm microbien ou floc est constituée de cellules bactériennes enveloppées par une matrice de grosses molécules de polymères, les EPS. Par définition, les EPS sont situées à l'extérieur de la surface de la cellule. Leur composition peut être contrôlée par différents processus, comme la sécrétion active, l'excrétion de matériau de surface des cellules, la lyse de cellule et l'adsorption de l'environnement (Wingender J *et al.*, 1999). Les fonctions de la matrice exopolysaccharidiques dans la fixation des bactéries aux surfaces sont diverses :

- ✓ l'agrégation des cellules bactériennes dans les floes et la stabilisation de la structure du biofilm ;
- ✓ la formation d'une barrière protectrice qui offre une résistance aux biocides ou autres effets nocifs ;
- ✓ la rétention d'eau ;
- ✓ la sorption des composés organiques exogènes pour l'accumulation d'éléments nutritifs de l'environnement ;
- ✓ l'accumulation d'activités enzymatiques, comme la digestion des macromolécules exogènes pour l'acquisition d'éléments nutritifs.

La matrice d'EPS est un moyen permettant la communication et la coopération entre les cellules dans un agrégat microbien. La stabilité de la structure et la proximité des bactéries entre elles dans un biofilm exigent que les cellules soient étroitement liées entre elles grâce aux EPS (Wingender J *et al.*, 1999). Il est clair que les EPS sont responsables de la liaison entre les cellules et d'autres particules environnantes (cohésion) et avec la surface (adhérence) (Allison, 2003; Characklis & Wilderer, 1989; Sutherland, 2001). La composition générale de l'EPS bactérien comprend des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des lipides, phospholipides et des substances organiques (Jahn & Nielsen, 1998; Sutherland, 2001; Wingender *et al.*, 1999). Selon Tsuneda *et al.* (2003), les protéines et les polysaccharides comptent pour 75–89 % de la composition des EPS du biofilm, indiquant qu'ils sont les principaux composants.

I.3.3. Rôle des EPS dans la consolidation du biofilms bactérien

La matrice d'EPS sert d'abord d'obstacle dans lequel le transport par diffusion l'emporte sur le transport par convection (Sutherland, 2001). Une caractéristique souvent attribuée aux EPS est leur effet protecteur général sur les micro-organismes du biofilm

contre les conditions défavorables. Par exemple, il a souvent été observé que les cellules du biofilm peuvent tolérer des concentrations élevées de biocides (Gilbert & Foley, 1996 ; Mah & O'Toole, 2001 ; Simoes & Vieira, 2009 ; Simoes *et al.*, 2005). L'acquisition de cette forte résistance des bactéries contenu dans les biofilms est censé être principalement due aux caractéristiques physiologiques des bactéries dans le biofilm, mais également à la fonction de barrière des EPS (Morton *et al.*, 1998; Simoes *et al.*, 2005). La matrice d'EPS retarde ou empêche les agents antimicrobiens d'atteindre leurs cibles (micro-organismes) dans le biofilm par limitation de la diffusion et/ou interaction chimique avec les protéines extracellulaires et les polysaccharides (Heinzel, 1998; Mah & O'Toole, 2001). En outre, dans la matrice polysaccharidique, les molécules requises pour la communication intercellulaire doivent s'accumuler à des concentrations suffisamment élevées pour être efficace (Pearson *et al.*, 1999; Sutherland, 2001).

I.3.4. Communication intercellulaire

La force motrice dans le développement communautaire bactérien est l'auto-organisation et la coopération entre les cellules. (Daniels *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 1998; Fuqua & Greenberg, 2002; Parsek & Greenberg, 2005). Ce concept apparaît particulièrement lors de l'examen des communautés bactériennes dans un biofilm (Parsek & Greenberg, 2005; Surette *et al.*, 1999). La signalisation intercellulaire joue un rôle dans l'adhésion et le détachement des biofilms (Daniels *et al.*, 2004; Donlan, 2002). Les bactéries sont considérées comme étant des microorganismes vivant au sein d'une communauté. Les bactéries ne sont pas des organismes solitaires. Elles sont par nature des organismes colonisateurs des surfaces. Elles exploitent et élaborent des systèmes d'interactions intercellulaires et de communication qui facilitent leur adaptation et leur évolution dans des environnements plus ou moins complexes (Davies *et al.*, 1998; Fuqua & Greenberg, 2002; Sauer & Camper, 2001). Le succès de l'adaptation des bactéries à l'évolution des conditions naturelles dépend de leur capacité à pressentir et à répondre à des conditions externes de l'environnement et moduler leur expression génétique en conséquence (Daniels *et al.*, 2004). Le quorum sensing est basé sur le processus d'auto-induction (Eberhard *et al.*, 1981). Le processus du quorum sensing fournit un mécanisme pour l'auto-organisation et la régulation des cellules microbiennes (Parsek & Greenberg, 2005). Les bactéries produisent des signaux organiques diffusibles, appelé initialement molécule

auto-inductrice (AI), qui s'accumule dans le milieu environnant pendant la croissance (Fuqua & Greenberg, 2002). Une forte densité cellulaire est le résultat d'une concentration élevée de ce signal. Cela induit l'expression de certains gènes et/ou des changements physiologiques dans les cellules voisines (Fuqua *et al.*, 1996; Parsek & Greenberg, 2005). Les auteurs parlent également de concentration seuil critique de la molécule de signal doit être atteinte avant qu'une réponse physiologique ne soit obtenue (Decho, 1999; Fuqua & Greenberg, 2002).

I.3.5. Résistance des bactéries du biofilm aux composés antimicrobiens

Il est bien établi que les biofilms bactériens présentent une résistance accrue aux traitements antimicrobiens par rapport aux cellules individuelles cultivées en suspension (Petrocci, 1983 ; Mustapha & Liewen, 1989 ; Frank & Koffi, 1990 ; Krysinski *et al.*, 1992). Cette résistance des bactéries au sein du biofilm a été largement observée et est attribuée à des propriétés variées du biofilm lui-même: réduction de la diffusion, réduction du taux de croissance en raison des changements physiologiques et la production d'enzymes dégradant les substances antimicrobiennes. En outre, il est difficile d'établir lequel de ces mécanismes a causé cette résistance ou plutôt la combinaison des mécanismes engendrant la résistance des populations. La résistance antimicrobienne exposée par le biofilm est liée à leur structure en trois dimensions et cette résistance est perdue dès que cette structure est interrompue (Hoyle *et al.*, 1992). Par conséquent, la production de quantités excessives de substances polymériques par les bactéries pendant la formation du biofilm et la croissance peut protéger les cellules en profondeur c'est-à-dire les cellules en contact avec le support. Lorsque des substances antimicrobiennes sont mis en contact avec ce biofilm, leurs effets sont estompés parce qu'elles diffusent par les EPS (Farber *et al.*, 1990 ; Hoyle *et al.*, 1990 ; Stewart, 1996).

Dans certaines des études, il a été démontré que les désinfectants tels que l'acide peracétique, le chlorure mercurique et le formaldéhyde n'ont aucun effet sur les biofilms situés sur des surfaces ouvertes et en particulier des revêtements de sol (Carpentier & Cerf, 1993). Il a été également signalé que *Listeria monocytogenes* adhérente à une surface alimentaire montrait une résistance accrue à des désinfectants classiques comme l'acide anionique et des composés d'ammonium quaternaire (Petrocci, 1983 ; Mustapha & Liewen, 1989 ; Frank & Koffi, 1990). L'explication raisonnable de l'efficacité réduite de ces agents contre les biofilms est la pénétration incomplète dans le biofilm par ces biocides (Huang *et al.*, 1995)

et la grande variation des conditions environnementales existant sur les surfaces de contact alimentaire. La présence de particules abiotiques, de kaolin et de carbonate de calcium dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Klebsiella pneumoniae* est également impliquée dans la réduction de l'efficacité des biocides (Srinivasan *et al.*, 1995).

En outre, les agents antimicrobiens sont beaucoup plus efficaces contre les cellules lors de leur croissance active c'est-à-dire que le meilleur désinfectant pour les cellules planctoniques n'est pas nécessairement ceux appropriés pour les cellules de biofilm (Holah *et al.*, 1990). Les cellules dans la couche profonde du biofilm reçoivent moins d'oxygène et de nutriments que celle à la surface du biofilm (Brown *et al.*, 1988). On parle de cellule dormantes ou simplement à croissance très faible dont l'état physiologique modifié entraîne une augmentation de résistance aux agents antimicrobiens (Gilbert *et al.*, 1990 ; Evans *et al.*, 1991 ; McFeters *et al.*, 1995). Dans les biofilms mixtes, une concurrence de nutriments entraîne une carence en éléments nutritifs, qui a également un rôle majeur dans la résistance des biofilms aux agents de traitement antimicrobien (Berg *et al.*, 1982 ; Jones, 1989).

Certaines études sur des bactéries issues d'aliments contaminés ont montré que la résistance contre les désinfectants est plus sévère dans les biofilms anciens (plus de 24 h) que dans les jeunes biofilms (Anwar *et al.*, 1990 ; Frank & Koffi, 1990 ; Lee & Frank, 1991 ; Wirtanen & Mattila-Sandholm, 1992).

Plusieurs auteurs ont démontré l'augmentation de la résistance des biofilms bactériens aux antibiotiques (Nickélifère *et al.*, 1985 ; Widmer *et al.*, 1990 ; Anwar *et al.*, 1992). Le mécanisme possible proposé pour cette résistance aux substances antimicrobiennes par les bactéries est la production d'enzymes dégradant ces substances c'est-à-dire les β -lactamases. Ces enzymes dégradent et inactivent les antibiotiques qui pénètrent par le biais de l'enveloppe de la cellule à leurs sites cibles. Au sein de biofilms, beaucoup d'enzymes hydrolytiques similaires ont été retrouvées et sont suspectées de participer à la protection des bactéries du biofilm. En outre, la résistance du biofilms peut également être due de façon plus triviale aux bactéries elles-mêmes.

CHAPITRE II : Nettoyage des équipements en industries agro-alimentaires

Résumé :

Ce chapitre est consacré au nettoyage des installations dans les agro-industries. Cette revue bibliographique portera plus spécifiquement sur la sanitarité en industries alimentaires ; une étude sur la résistance des biofilms au nettoyage sera abordée. Aussi ce chapitre fera un point sur les différentes techniques d'analyse utilisées pour observer ou quantifier les biofilms présents sur les surfaces inertes. Nous donnerons des éléments sur les aspects réglementaires relatifs au nettoyage et terminerons par une présentation des modèles analytiques proposés pour prédire et décrire les opérations de nettoyage.

II. 1. Introduction

La présence de souillures ou plus spécifiquement d'encrassant microbien sur les surfaces des équipements dans les industries de transformation alimentaires doit être évité. Ainsi les risques qui en découlent concernent à la fois la qualité du produit final et la santé du consommateur.

Depuis ces quatre dernières décennies, les travaux sur la formation de dépôts à la surface des équipements a fait l'objet de nombreux travaux en particulier pour ce qui concerne les procédés membranaires. Par ailleurs, l'encrassement et le nettoyage ont particulièrement été étudiés dans le cas des surfaces assurant le transfert de chaleur avec pour ce qui concerne l'agro-industrie les industries laitières. Nous pouvons citer les travaux du laboratoire (Gallot-Lavallée *et al.*, 1985, 1986 ; Lalande *et al.*, 1989 ; Delaplace *et al.*, 1995), de l'université de Birmingham (Fryer *et al.*, 1996 , Belmar-Beiny *et al.*, 1993) ou de l'université de Cambridge (Wilson *et al.*, 1999, 2002). Des ouvrages récents (Lelieveld, 2003, 2005) font également le point sur les avancées proposées ces dernières années. Il s'agit d'ouvrages de références applicables en industries alimentaires sur l'hygiène et la conception hygiénique des équipements.

Comprendre l'encrassement permet de définir le type de nettoyage à appliquer. Cette compréhension de la formation des dépôts alimentaires et ultérieurement la formation de

biofilm est essentielle pour définir comment les éliminer et donc, comment améliorer l'efficacité du processus de nettoyage.

Par exemple pour l'encrassement laitier, trois éléments sont impliqués dans l'élimination des souillures : la surface de transfert de chaleur, le dépôt et les solutions détergentes de nettoyage y compris les conditions d'application. Les mécanismes suivants sont par exemple proposés pour expliquer le processus de nettoyage des dépôts alimentaires (Plett, 1985) : mouillage, désorganisation mécanique, érosion, gonflement et désorption, émulsion, hydratation, saponification et enfin la dispersion. L'élimination des dépôts peut être régie par une combinaison de transfert de quantité de mouvement matière (diffusion) couplé à la réaction chimique (Bird & Fryer, 1991), tout ceci pouvant être contrôlé.

Historiquement, les équipements destinés à la transformation des aliments étaient ouverts et nettoyés individuellement. La production à grande échelle a conduit à la nécessité pour les industriels la mise en place de systèmes de Nettoyage-En-Place (NEP). Ces systèmes permettent le nettoyage des équipements soit par la circulation de fluides nettoyants, soit par un nettoyage chimique et mécanique, soit par le frottement visqueux ou l'impact de jets dans le cas par exemple des cuves. Ces processus très développés sont automatisés, mais sont rarement efficaces s'ils ne sont pas optimisés.

Les régimes de nettoyage comportent généralement des séquences par cycle de nettoyage. Voici un exemple classique:

- pousse à l'eau ou à l'air pour récupérer le produit alimentaire encore présent dans les installations et les éliminer des surfaces.
- pré rinçage : circulation d'eau chaude ou de l'eau froide (alors combinés à la pousse à l'eau) pour éliminer les substances faiblement liées à la surface ;
- phase de détergence : action chimique du nettoyage (acide ou alcalin) ayant pour but d'agir sur le dépôt de façon à favoriser son éliminer de la surface ;
- post-rinçage : on parle aussi de rinçage final ou de rinçage intermédiaire avant désinfection dans lequel les dépôts et résidus chimiques sont éliminés par circulation d'eau;
- une possible désinfection ;
- rinçage final par circulation d'eau avant une nouvelle transformation des produits.

L'encrassement et le nettoyage ont des impacts économiques et environnementaux. Les conséquences financières ont été qualifiées ainsi par Pritchard (1988). Nous pouvons citer par exemple:

La perte de production : réduction de l'efficacité des processus (chauffage, refroidissement) et donc la nécessité d'arrêter la production pour nettoyer les installations.

Les frais de dépenses énergétiques : augmentation du pompage et du chauffage électrique ce qui va nécessiter à la longue l'achat d'une plus grande surface d'échangeur de chaleur et une capacité de pompage supplémentaire.

Les frais liés à la réduction des impacts environnementaux : les conséquences environnementales sont de plusieurs ordres comme l'utilisation de grandes quantités d'eau potable, le rejet de composés de dégradation des souillures ayant réagies avec les molécules détergentes ou désinfectantes, le traitement des eaux résiduaires.... (par exemple).

En outre, les solutions détergentes utilisées pour le nettoyage doivent être neutralisées et les eaux résiduaires traitées avant d'être émises dans la nature. Par exemple, les phosphates classiquement ajoutés encore récemment aux agents de désinfection afin de réduire la dureté de l'eau de nettoyage, est un risque écologique en raison de l'eutrophisation des rivières. Plus récemment on assiste à une prise de conscience de la présence de produits organochlorés cancérigènes retrouvés dans l'environnement après utilisation de produits chlorés pour la désinfection (appel d'offre Européen KBBE-5-2011). Par ailleurs, nous pouvons citer également les agents de complexations ajoutés aux solutions de nettoyage pouvant mobiliser les métaux lourds (Grasshoff, 1997). La récupération et la réutilisation des produits chimiques du NEP réduisent la charge d'assainissement même si in fine il n'est pas possible de réduire complètement les rejets.

Les procédés de nettoyage sont actuellement menés de manière semi-empirique. La durée du nettoyage est choisie de façon à garantir un nettoyage visuellement correct pour un volume de solution détergente donné. Les outils de suivi disponible pour le nettoyage en place (capteurs de pression, température, pH-mètre, conductimètre...) permettent de s'assurer de la répétabilité des opérations si ce n'est du maintien de l'efficacité de cette opération unitaire. Bien que beaucoup de travaux de recherche traitent de l'encrassement des surfaces pour améliorer les transformations en industries alimentaires (Georgiadis *et al.*, 1998 ; Petermeier *et al.*, 2002 ; Grijspeerd *et al.*, 2004), il existe peu d'études sur l'optimisation du nettoyage. La compréhension des mécanismes de nettoyage est indispensable pour comprendre comment l'encrassement est éliminé. Des paramètres

comme la température, le type d'agent chimique et sa concentration, le volume circulant pour les opérations de rinçage ou pour la phase de détergence sont tant d'éléments sur lesquels l'industriel peut agir. Le contrôle et la surveillance du nettoyage est également critique et il serait plus facile à optimiser si l'état et le niveau de l'encrassement dans toute l'installation sont connus de façon précise.

L'objectif de ce chapitre est de reprendre les avancées récentes des travaux sur le nettoyage, en regardant plus particulièrement ce qui concerne l'élimination d'encrassement biologiques comme les biofilms.

II.2. Présence de biofilms bactériens en environnement agroalimentaire et conséquences.

Il est bien établi à ce jour que de nombreux microorganismes pathogènes forment des biofilms à la fois sur les aliments et sur les surfaces potentiellement en contact avec les denrées alimentaires lorsque les conditions environnementales sont favorables. Depuis les travaux de Duguid *et al.* (1966) sur *Salmonella*, de nombreuses études ont décrit la capacité des pathogènes d'origine alimentaire à s'attacher aux aliments et aux surfaces alimentaires. Nous pouvons citer les travaux sur *listeria monocytogenes* (Frank & Koffi, 1990 ; Herald & Zoottola, 1988b ; Mafu *et al.*, 1990), *Yersinia enterocolitica* (Herald & Zoottola, 1988a), *Campylobacter jejuni* (Kausela *et al.*, 1989) et *Escherichia coli* O157: H7 (Dewanti & Wong, 1995). L'adhésion des microorganismes pathogènes aux surfaces alimentaires et leur développement sous forme de biofilms ou au sein de biofilms multi-espèces comme c'est généralement le cas peut entraîner des risques importants pour la santé des consommateurs comme l'ont montré les problèmes récents liés à la présence par exemple d'*E. coli* O157:H7 sur des produits carnés (Douro *et al.*, 2011) ou *E.coli* entéro-hémorragique (ehc) sur produits végétaux (note de l'anses en juin 2011). Des études réalisées sur la composition microbienne des biofilms qui se forment à la surface des équipements de traitement de diverses industries (tableau II.1) ont été décrites dans plusieurs travaux (Bagge-Ravn *et al.*, 2003 ; Gunduz & Tuncel, 2006 ; Guobjornsdottir *et al.*, 2005 ; Sharma & Anand 2002). Ces enquêtes ont mis en évidence la présence de ces biofilms « pathogènes » aussi bien au sein de machines qu'aux surfaces des ateliers de transformation. Dans les industries laitières Kirtley & McGuire. (1989) précisent que les risques sanitaires sont dues à la présence de biofilms sur les surfaces, la colonisation microbienne des réservoirs de stockage de lait, l'encrassement des surfaces d'échange de chaleur et la présence de formes sporulées sur les matériaux d'emballage et de conditionnement. Les spores de *B. cereus* par exemple, présentes

dans le lait cru avant traitement peuvent rester sur certaines parties des équipements, dans des zones d'échange de chaleur en raison de leur thermo-résistance ce qui favorise leur germination et leur développement sous forme de biofilms et ainsi contaminer le produit fini (Te Giffel *et al.*, 1997).

Une étude réalisée par Eneroth *et al.* (1998) montre la contamination des emballages de lait pasteurisé par des bactéries Gram (-) psychrotrophe, cette contamination a été associée à l'eau de rinçage. Cela suggère que ces bactéries ont formé des biofilms dans le système de distribution des eaux de rinçage. Une autre étude réalisée par Langeveld *et al.* (1995) dans une installation pilote au laboratoire à montré une augmentation de la concentration bactérienne d'un facteur de 10^6 . Ainsi dans leur expérience ils ont chauffé du lait dans un échangeur tubulaire en acier inoxydable et montré le lien direct entre la densité de bactéries sur les parois des tubes et la concentration de contaminants dans le lait après chauffage. Langeveld *et al.* (1995) et Murphy *et al.* (1999), suggèrent que la présence et l'augmentation de la contamination bactérienne du lait est la conséquence d'une contamination préalable des équipements utilisés pour la transformation du lait. Les travaux récents de Scott *et al.* (2007) situent l'origine de la contamination du lait en poudre par des bactéries sporulées au niveau des échangeurs de préchauffage du lait et de l'évaporateur. Les spores étaient détectées entre 9 et 18h après le début de la production. Une des conséquences était la présence de 10^6 ufc.ml⁻¹ dans le produit fini après 18h.

Tableau II.1: Espèces microbiennes dans les biofilms de différents environnements industriels agro-alimentaires.

Industries	Pourcentage de biofilm isolé	Références
Ligne de production	<i>Staphylococcus aureus</i> (8)	Sharma & Anand (2002)
Industrie laitière	<i>Bacillus cereus</i> (12)	
Equipement	<i>Escherichia coli</i> (11)	
pasteurisation	<i>Shigella sp.</i> (11)	
Crème glacé	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gunduz & Tuncel (2006)
Equipement	<i>Shigella</i>	
Tapis roulant		
Unité d'alimentation		
Industrie de transformation de poisson,	<i>Neisseriaceae</i> (25)	Bagge-Ravn <i>et al.</i> (2003)
unité de transformation de caviar	<i>Pseudomonas</i> (6)	
	<i>Vibrio</i> (10)	
	<i>Listeria</i> (3)	
Industrie de transformation de crevettes	<i>Pseudomonas</i> (66)	Guobjornsdottir <i>et al.</i> (2005)
	<i>P. fluorescens</i>	
	<i>P. putida</i>	
Industrie de transformation de poisson	<i>Enterobacteriaceae</i> (27)	Guobjornsdottir <i>et al.</i> (2005)
	<i>Serratia liquefaciens</i>	

Les technologies membranaires sont également la source de contaminations que ce soit en ultrafiltration (uf) ou en osmose inverse (RO) largement utilisés dans l'industrie laitière et alimentaire et dans les procédés de traitement d'eau résiduaires (Golomb & Besik, 1970 ; Glover, 1985 ; Cheryan *et al.*, 1986). Par exemple, dans un processus de traitement des eaux usées par osmose inverse, le développement d'un biofilm microbien contribue à une réduction significative des flux d'eau et de la détérioration de la performance globale de membrane (Ridgeway *et al.*, 1983 ; Ridgeway *et al.*, 1984). Pour le secteur alimentaire, nous pouvons citer une étude récente sur le rôle de l'adhésion de spores bactériennes (*Bacillus cereus*) sur les performances de membranes céramiques (Blanpain-Avet *et al.*, 2011).

II.3. Méthodes d'analyses des biofilms

Il est important non seulement de pouvoir détecter la présence de biofilms mais de pouvoir quantifier et qualifier la contamination présente et enfin identifier la présence de pathogènes. Les différentes méthodes utilisées pour l'échantillonnage et l'énumération de ces microorganismes intègrent des étapes comme l'écouvillonnage par exemple à l'aide de chiffonnettes ou de rinçages suivis par de la remise en culture, ou encore par contact direct avec des milieux de culture gélosés (boîtes contact) permettant le décrochement de la contamination avec mise en culture pour visualiser le développement de colonies facilement dénombrables. Ces méthodes d'incubation conventionnelles ont été largement utilisées depuis des années comme méthodes quantitatives de la contamination des surfaces à la fois internes et externes (Flemming & Geesey 1991). Encore très récemment, Asséré *et al.* (2008) rappellent que la quantification des micro-organismes adhérents sur des surfaces abiotiques solides est un problème récurrent dont les solutions proposées aujourd'hui ne sont pas complètement satisfaisantes et se résument à l'écouvillonnage (Rose *et al.*, 2004), l'impédance-métrie (Revol-Junelles *et al.*, 2005) ou la PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel (Bruhn *et al.*, 2006). Il faut distinguer méthodes de laboratoire et méthodes envisageables sur site industriel qui se résume pratiquement à l'écouvillonnage, même si des tentatives d'utilisation des ultrasons ont été proposées (Oulahal-Lagsir *et al.*, 2000). Un dernier écueil à ces techniques de remise en culture (Branda *et al.*, 2005), est le temps de réponse pouvant aller de plusieurs heures à plusieurs jours. L'intérêt aujourd'hui va au développement de méthodes rapides utilisant les méthodes dites moléculaires types PCR en temps réel par exemple. Par ailleurs, la présence de formes viables non cultivables est aussi une difficulté quand on souhaite suivre l'hygiène des installations. Récemment Marouani-

Gabri *et al.* (2010) démontrent la pertinence des techniques moléculaires par utilisation d'ethidium monoazide associé à de la PCR quantitative et montrent ainsi l'accroissement de la population bactérienne d'*E. coli* O157:H7 au cours des cycles d'encrassement, de nettoyage et de désinfection sous forme viable mais non cultivable. Les auteurs se sont également largement intéressés à l'observation directe des biofilms développés sur les surfaces solides. Nous pouvons citer les travaux en microscopie optique à épifluorescence (Holah *et al.*, 1988 ; Holah *et al.*, 1989 ; Wirtanen & Mattila-Sandholm, 1993) ayant permis d'appréhender la présence et l'organisation de biofilms sur des surfaces industrielles. Nous pouvons citer également les techniques de microscopie à contraste interférentiel, la microscopie confocale laser (MCL) permettant de visualiser couche par couche, et pour des observations à plus petites échelles on trouve la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie de force atomique (AFM) pour des observations jusqu'à l'échelle nano (Notermans *et al.*, 1991 ; Zottola, 1991 ; Ladd & Costerton, 1990 ; Caldwell *et al.*, 1992 ; Debeer *et al.*, 1997). Par ailleurs, la microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM) a également été largement utilisée pour visualiser les cellules bactériennes contenues dans le biofilm (Little *et al.*, 1991 ; Hodgson *et al.*, 1995). Cette technique permet de visualiser les échantillons sans avoir besoin des procédures microscopiques classiques comme la déshydratation, la fixation et la coloration. Aussi, cette méthode permet de conserver la plupart des structures associées aux échantillons biologiques qui restent dans un état hydratée et viable.

Il existe cependant des limites quant au bon prélèvement des biofilms sur des surfaces situées dans des zones peu accessibles comme la plupart des surfaces en circuits fermés. En effet, beaucoup de lieux de croissance des biofilms se situent dans des zones difficiles d'accès, telles que les rainures ou les micro-crevasses. Une autre difficulté à ces techniques de remise en culture est liée à la présence de formes viables mais non cultivables (Carpentier, 2009) liées aux contraintes environnementales spécifiques des sites industriels (dessiccation, carence en nutriments, pH, actions de détergents et désinfectants... endommageant les cellules sans les tuer (Wong & Cerf, 1995). Toutefois des cellules viables mais non cultivables de *Salmonella typhimurium* soumises à un traitement au chlore ont été correctement énumérées en recourant à la procédure de comptage de viable directe (DVC) en combinaison avec la technique Indirect Fluorescent-Antibody (Leriche & Carpentier, 1995).

II.4. Nettoyage des souillures dans les industries agroalimentaires

Le nettoyage doit permettre d'éliminer toute souillure présente sur les surfaces des équipements. Les industriels ont pour obligation le maintien permanent de la qualité hygiénique de leurs équipements. Cette obligation peut revêtir 3 aspects : obligation commerciale, obligation morale et obligation légale.

Le degré de propreté d'une installation industrielle sera défini à l'aide des termes suivants :

propreté physique : signifie qu'aucun résidu ne doit être physiquement détectable ;

propreté chimique : correspond à l'élimination de toute trace de résidu chimique ;

propreté bactériologique : induit la disparition complète des microorganismes et macromolécules adhérentes aux surfaces.

La propreté des surfaces est assurée par l'application de forces d'arrachement supérieures aux forces d'adhésion des souillures. L'utilisation de détergents et de chaleur permettent la diminution des forces de cohésion souillures-soutiens et rendent plus aisé l'arrachement des souillures quand elles sont soumises à un cisaillement généré par l'écoulement du fluide dans les équipements fermés.

Le Nettoyage En Place est une technique largement répandue en agro-industrie pour le nettoyage des systèmes fermés composés de réseaux de connections tubulaires reliant différents équipements et cuves par circulation d'eau, de détergents et/ou de désinfectants (Bénézech & Lalande, 1999).

La visualisation de l'arrachement lors du nettoyage des dépôts de lait, de lactosérum et de concentré de protéine (Grasshoff, 1989 ; Bird & Bartlett, 1995 ; Christian, 2004) ont illustré la nature non uniforme de la suppression de ces dépôts. Le processus d'élimination a été décrit comme comprenant les mécanismes suivants :

Le gonflement - la solution alcaline entre en contact avec le dépôt et cause le gonflement liée principalement à l'hydratation du dépôt associé à une dénaturation de la fraction protéique par les ions hydroxydes (OH⁻).

L'érosion - suppression uniforme des dépôts par les forces cisaillement après diffusion progressive du détergent dans la souillure.

La désintégration - le dépôt est soit éliminé par paquets plus ou moins importants soit on parle de dissolution dans la solution détergente.

La désincrustation - Il reste en surface des éléments des souillures initiales protégés qui vont subir l'action du détergent plus que de l'action mécanique. Le choix du détergent se révèle ici très important pour éviter des temps de nettoyage trop longs. Ce phénomène a été montré pour les biofilms bactériens (Lequette *et al.*, 2010).

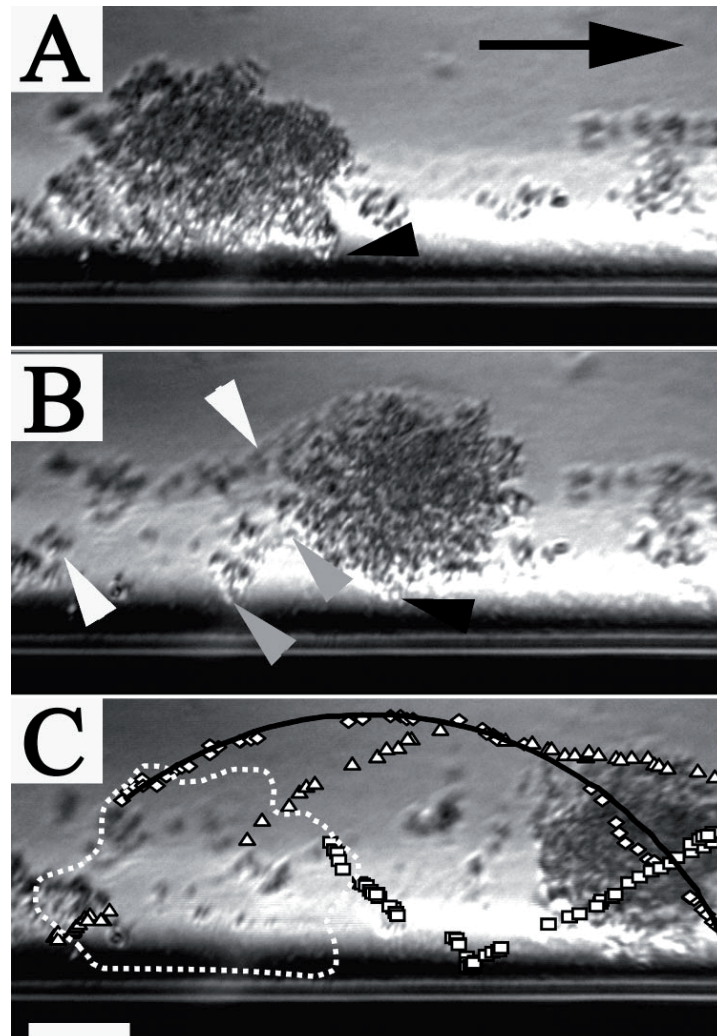


Figure II.1. : Présentation d'un mécanisme de détachement des cellules individuelles et des amas de cellules de biofilms établis d'après Rupp *et al.* (2005).

La figure II.1 montre par exemple le détachement de biofilms de 5 jours à *Staphylococcus aureus* adhérents à du verre et soumis aux contraintes de cisaillement générées par le flux circulant. Le biofilm sous forme d'amas (micro-colonies de 50 à 100 μm) ancrés à la surface (flèches noires) va se décrocher en partie par rupture des zones d'ancrage préalablement étirées (flèches grises) pour finalement rouler à la surface (trajectoire matérialisée par des carrés et des triangles pour des points particuliers).

Le nettoyage fait appel à des mécanismes complexes qui dépendent de paramètres variés liés au dépôt, à l'environnement et à la surface de contact. Lors du NEP, il est possible d'agir sur ces mécanismes en faisant varier les paramètres uniquement liés à l'environnement relevant de la chimie et de la mécanique des fluides. Nous nous proposons ici de donner plus de détails sur leurs actions respectives en privilégiant les dépôts biologiques.

II.5. Paramètres influençant l'efficacité du Nettoyage En Place

Ces paramètres se regroupent en 3 classes de paramètres qui sont :

Les conditions de production, à savoir quel contaminant bactérien est potentiellement présent, le milieu alimentaire et les conditions d'écoulement. Le nettoyage d'une ligne industrielle sera conditionné par la nature, l'histoire et la force d'adhésion de souillures.

La conception des équipements industriels concerne à la fois les matériaux utilisés et leurs géométries. La conception hygiénique des équipements a pour but de limiter l'encrassement et de favoriser le nettoyage de ces surfaces. Depuis 1989, en Europe, les normes sur la conception hygiénique des surfaces sont régies par la Directive 2006/42/EC publiée le 9 Juin 2006. Les équipementiers peuvent également se référer aux guides édités par l'EHEDG (European Hygienic Engineering and Design Group ; www.ehedg.org).

La directive comporte deux exigences : exigence sur les matériaux de fabrication et exigence sur la géométrie des équipements. Les principes généraux de la conception d'un équipement dit hygiénique peuvent être résumés comme suit :

- les joints doivent être résistants aux agressions mécaniques, thermiques et chimiques. Ils doivent être conçus de manière à éviter l'accumulation de produits à l'arrière des joints ;
- les surfaces sans contact avec le produit, ainsi que les dispositifs de fixation de l'équipement, doivent être conçus de manière à éviter l'accumulation de souillures, bactéries et poussières ;
- les accouplements dynamiques doivent être conçus pour permettre un nettoyage et une désinfection efficace ;
- les équipements doivent être entièrement vidangeables et ne doivent pas présenter de zones mortes ;

- les équipements doivent être conçus de façon à empêcher l'entrée et la progression dans le circuit de contaminants d'origine externe.

Par ailleurs, un point particulièrement contraignant pour les équipementiers est l'obligation légale de fournir la procédure de nettoyage à mettre en œuvre. Compte tenu de ce que nous venons d'évoquer dans les paragraphes précédents, cela se révèle parfois très difficile.

II.5.1. Les conditions opératoires du NEP

Il s'agit de façon relativement triviale du choix du détergent (nature et concentration), de sa température, du débit volumique aussi bien en rinçage qu'en nettoyage et du temps. Sinner (1960) présente ces conditions sous forme d'un cercle comme présenté figure II.2.

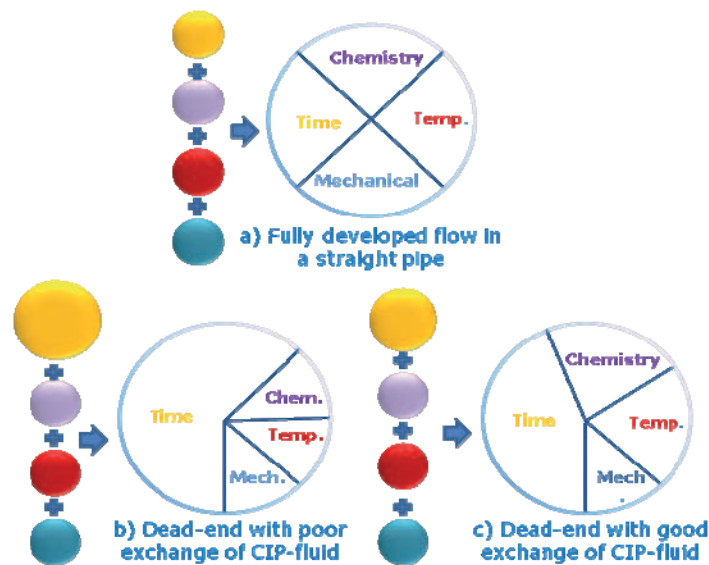


Figure II.2. : Les quatre composantes du nettoyage sous forme d'un cercle partitionné d'après Sinner (1960) et appliqué au nettoyage en place de conduites droites ou présentant des « bras morts » plus ou moins marqués (échanges bon ou mauvais entre le fluide piégé dans le bras mort et le flux principal).

II.5.2. Rôles du détergent

Selon Guilbert (1994), le détergent pour être efficace doit répondre à certains critères (solubilité rapide, mouillabilité des surfaces, action dispersive, toxicité minimum, non corrosif, etc....). Le choix du détergent est guidé par la nature des dépôts à éliminer. Le pouvoir saponifiant des détergents alcalins permet d'éliminer les dépôts organiques contenant des lipides, alors que les dépôts minéraux pourront être dissous par des agents acides (Corrieu, 1981).

La soude est le principal composant des détergents alcalins. Elle détruit de nombreuses souillures organiques par saponification et facilite leur solubilisation (Vincent, 1999). Les principaux détergents acides sont les acides phosphoriques et nitriques agissant sur la fraction minérale par dissolution mais reconnu également comme ayant une action sur la fraction organique des souillures.

La structure des souillures est souvent complexe, mixant protéines, matières grasses, minéraux et microorganismes. L'utilisation de ces deux types de détergents (alcalin et acide) à la suite l'un de l'autre s'avère nécessaire. Il y a relativement peu d'étude concernant l'action spécifique des détergents sur les biofilms. La majorité des efforts des différents auteurs a porté sur l'action des désinfectants. Nous pouvons citer les travaux récents de Lequettes *et al.* (2010) mettant en évidence la pertinence de l'utilisation de la détergence enzymatique sur l'élimination des biofilms. Dans la pratique industrielle, le choix des détergents est majoritairement gouverné par l'élimination de souillures organiques et minérales plus que par l'élimination de souillures microbiennes (Gibson *et al.*, 1999). La majorité des exemples tirés de la littérature concernent le nettoyage des équipements ouverts et des ateliers. Gibson *et al.* (1999) ont montré que l'utilisation de détergents alcalins, neutres ou acides avant l'aspersion des surfaces par de l'eau à 17,2 bar n'augmente pas significativement l'élimination de bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*. Cependant ces détergents affectent la viabilité des microorganismes et ainsi minimise le risque de dispersion de la contamination par l'action de jets sous pression. Récemment Burfoot & Middleton (2009) montrent une efficacité réelle (5 réductions décimales) pour des biofilms à *P. aeruginosa* sur de l'acier. Ils expliquent d'abord les différences avec l'étude de Gibson *et al.* (1999) réalisée dans le même institut par le choix du détergent (détergent alcalin appliqué sous forme de mousse) mais souligne la différence fondamentale entre les deux approches : l'utilisation de cellules adhérentes en 1999 et de biofilms dix ans plus tard. Ils suggèrent ainsi une désorganisation du biofilm par le détergent qui permet d'ailleurs d'atteindre une efficacité comparable avec des jets basse pression par rapport aux jets haute pression. Récemment Lequette *et al.* (2010) ont étudiés l'action de 7 protéases et polysaccharidases sur l'élimination de biofilms de 17 espèces bactériennes majoritairement issues d'environnement industriels. Les serines protéases et alpha-amylases se sont révélées les plus efficaces. En revanche, les enzymes protéolytiques se sont révélées efficaces sur une gamme plus importante de microorganismes que les polysaccharidases. Des essais ont été réalisés dans des conditions de NEP pour des biofilms à *Pseudomonas fluorescens* ou à *Bacillus cereus*. Si dans le cas de *Bacillus*, il est préférable d'utiliser

les serines proteases, avec *Pseudomonas* ce sont les polysaccharidases qui sont plus efficaces. Il s'avère également que l'utilisation de chélatants et ou de tensio-actifs favorisent l'élimination de ces deux types de biofilms quelque soit l'enzyme.

Une combinaison d'enzymes visant plusieurs composants des EPS présents dans les biofilms, l'addition de tensio-actifs, d'agents dispersants ou chélatants s'avèrent comme autant d'alternatives intéressantes aux détergents purement chimiques. Par ailleurs, l'impact environnemental de tels détergents s'avère également plus intéressant.

L'efficacité du détergent sur le décrochement est évidemment liée à sa concentration mais une augmentation n'est pas toujours le gage d'une augmentation de l'efficacité. Le seul exemple disponible à notre connaissance a été observé dans le cas de dépôts protéiques. Fryer & Bird (1994) et Bird & Bartlett (1995) situent l'optimum à 0,5% d'hydroxyde de sodium pur. Cette concentration optimale est comprise entre 0,5 et 1% pour une souillure obtenue après chauffage de lait écrémé reconstitué ou de solution de protéines de lactosérum (Journinck & Brinkmann, 1994).

II.5.3. La température de circulation du fluide détergent.

Les seuls exemples disponibles concernent l'élimination de souillures organiques. Jennings (1959) a montré que l'effet de la température peut être imputé à l'accélération des réactions entre détergent et dépôt. (Schussler, 1970 ; Gallot-Lavallée *et al.*, 1984) ont à leur tour montré qu'une augmentation de la température s'accompagne généralement d'une augmentation de la vitesse de nettoyage. Schussler. (1976) affirme qu'une augmentation de la température entraîne la diminution de la viscosité du milieu permettant une diffusion plus rapide du détergeant vers le noyau turbulent des produits de cette réaction. Fryer & Bird (1994) prouvent qu'une augmentation de 10°C de la température entre 50 et 80°C double la vitesse d'enlèvement.

En effet, plus la température est élevée, plus les réactions sont rapides mais elles peuvent s'accompagner de réactions indésirables entre le détergent et les matériaux des équipements nettoyés. Les faibles températures permettent de préserver les équipements mais rendent les opérations de nettoyage trop longues et donc économiquement inintéressantes. De plus, selon Perlat *et al.* (1986) des températures inférieures à 40°C entraînent des réactions de gélification entre des protéines et le détergent (gel protéique), ce qui rend le nettoyage impossible. C'est pour cette raison qu'il est maintenant clairement établi que l'enlèvement

des dépôts protéiques se fait de manière optimale à partir de 65°C. Le tableau 2 donne quelques valeurs de température communément utilisées dans le nettoyage des équipements en industrie agroalimentaire (Guilbert, 1994).

Tableau II.2.: Températures fréquemment utilisée en nettoyage en fonction des gammes de température dans les industries agro-alimentaires selon Guilbert (1994).

Températures	Equipements/ procédé de transformation
5°C à 40°C	Réacteur, tank de stockage ou d'alimentation,
50°C à 70°C	Tank de stockage de lait, crèmes, yaourts,
70°C à 90°C	Installation de transformation des aliments, tubes de connexion, refroidisseur,
90°C à 130°C	Installation de traitement UHT, unité de stérilisation de dessert,

II.5.4. Le temps de circulation du fluide détergent.

La durée de nettoyage est difficile à prévoir ce qui oblige les entreprises qui commercialisent les équipements de NEP à proposer des marges de sécurité très importantes. Quand à l'industriel, il ajuste en général lui-même sa durée de nettoyage en réalisant des contrôles pendant le NEP (limpidité de l'eau de rinçage, inspection de points critiques, contrôle des pH). Il n'est pas rare de voir l'industriel sous-traiter l'ensemble des opérations d'hygiène à des sociétés vendant des détergents et désinfectants.

La sélection des temps de circulation des eaux de rinçage ou de détergent est souvent liée à l'observation des effluents qui doivent apparaître clairs sans matières visibles en suspension, à l'inspection visuelle de l'enlèvement complet des souillures dans les zones critiques. Les travaux de recherche que nous pouvons citer ici sont ceux faisant appel à l'identification des cinétiques de nettoyage que nous nous proposons de développer dans un prochain paragraphe à part.

II.5.5. L'action mécanique.

Au cours du processus de NEP, la force de cisaillement à la paroi est fournie par le flux du fluide circulant. Si les premiers travaux dans le domaine non seulement démontrent

le rôle du cisaillement dans les phénomènes d'élimination des souillures alimentaires des surfaces, il existerait un seuil de cisaillement en dessous duquel l'effet mécanique du flux est négligeable (Jennings *et al.*, 1957 ; Schlüssler, 1976). Si cette vision bien que séduisante a quelque peu été abandonnée, les travaux les plus récents insistent encore sur le rôle déterminant de l'hydrodynamique sur l'efficacité du nettoyage. Selon Lelièvre *et al.*(2002), Jensen *et al.* (2005) et Blel *et al.*(2007), l'action des forces hydrodynamiques à la paroi est essentielle en particulier lorsque l'on s'intéresse à l'élimination de la contamination microbienne. Ces forces dépendent du débit volumique circulant et de l'organisation de l'écoulement donc de la géométrie des lignes de transformation. La connaissance de la répartition de ces forces est indispensable dans une démarche d'amélioration des opérations de nettoyage (Jensen *et al.*, 2007) qui peut s'envisager en modifiant la géométrie des systèmes facilitant ainsi l'opération de nettoyage. Par ailleurs, les auteurs ont montré le rôle déterminant de la valeur moyenne de la contrainte pariétale et de son taux de fluctuation (Lelièvre *et al.*, 2002 ; Jensen *et al.*, 2005 ; Blel *et al.*, 2007) lié à la turbulence. Blel *et al.* (2010) montre le lien entre la distribution de taille des structures turbulentes en proche paroi et le phénomène de déposition de bactéries sporulées en suspension dans le flux circulant. Par ailleurs, l'augmentation de la présence de structures turbulentes générées à partir de la paroi permet d'expliquer l'augmentation de l'arrachement avec l'augmentation du flux.

Par conséquent, plus le débit est élevé, plus le temps de nettoyage pour la même efficacité est court. Le coût énergétique et le coût d'investissement dans des équipements de pompage doit alors être pris en compte. C'est pourquoi, ces dernières années, des études ont été réalisées avec des conditions mettant en œuvre des débits pulsés (Gillham *et al.*, (2000), Blel *et al.*, 2009) associant vitesses faibles et vitesses rapides, la moyenne de la vitesse débitante pouvant être relativement faible. Les premiers résultats semblent prometteurs. Gillham *et al.* (2000) montrent que les flux pulsés ont un effet négligeable sur la phase initiale de la cinétique de nettoyage correspondant au «gonflement» de l'encrassement laitier. En revanche, l'effet est largement significatif et positif sur l'amélioration de la dernière phase de la cinétique du nettoyage. Pour Blel *et al.* (2009), il est encore souhaitable d'optimiser l'association des paramètres que sont la fréquence et l'amplitude des pulsations, comme les temps attribués aux valeurs hautes et basses des débits volumiques.

II.6. Cinétiques de décrochement de bactéries

Les modèles mathématiques sont les principaux outils permettant de décrire quantitativement la dynamique de tout type de processus. Whiting & Buchanan (1993), décomposent la démarche modélisatrice de la microbiologie prévisionnelle en trois étapes :

- i. la modélisation primaire décrit l'évolution d'une population bactérienne en fonction du temps,
- ii. la modélisation secondaire décrit l'évolution des paramètres primaires en fonction de facteurs environnementaux (par exemple le pH de l'aliment) ou de facteurs propres aux cellules bactériennes (par exemple leur état physiologique),
- iii. la modélisation tertiaire est alors la combinaison des modèles primaire et secondaire dans un logiciel permettant, par exemple, de calculer l'évolution d'une population bactérienne en fonction de facteurs environnementaux particuliers.

Nous avons choisi de nous intéresser aux travaux de microbiologie prévisionnelle qui proposent cette approche cinétique appliquée aux populations bactériennes présentes dans les produits alimentaires. Parmi ces travaux, nous pouvons citer les articles de Valdramidis *et al.* (2004) et de McMeekin *et al.* (2002) ou l'ouvrage de Mckellar & Lu (2003) sur la modélisation des « réponses » microbiennes dans les aliments. Nous nous intéresserons ici seulement aux cinétiques de décrochement et donc nous ne regarderons que l'étape dite de modélisation primaire.

La modélisation des courbes de survie liées à un traitement thermique est utilisée depuis le début du vingtième siècle afin de quantifier et d'optimiser l'impact des conditions de traitement. Le modèle log-linéaire (cinétique d'ordre 1) est traditionnellement appliqué pour décrire l'inactivation thermique de populations bactériennes (Chick, 1908). Dans ce cas, la courbe de survie est donc décrite par :

$$N(t) = (N_0)e^{-(k_2)t} \quad (II.1)$$

Où N représente l'effectif de la population survivante au temps t , N_0 est l'effectif de la population au début de l'application du stress ($t=0$), et k est le taux de destruction. L'expression usuelle de ce modèle est celle en logarithme décimal, où le taux de destruction k cède sa place à un paramètre plus facilement interprétable qui est la durée de réduction décimale (D)

$$N(t) = (N_0)10^{-\frac{t}{D}} \quad (II.2)$$

La réduction des courbes de survie au comportement log-linéaire a l'avantage de la simplicité d'utilisation et d'interprétation. Cette vision simpliste des cinétiques d'inactivation s'est répandue universellement, et a été appliquée à l'optimisation des barèmes de stérilisation ou de pasteurisation. Mais l'emploi abusif de ce modèle peut conduire à des erreurs d'optimisation si l'inactivation de la population cible dévie trop de la log-linéarité.

Si nous nous référons aux travaux de la littérature donnant des propositions de modèles pour décrire les cinétiques de nettoyage, nous devons remonter aux années cinquante avec les travaux de Jennings *et al.* (1957). Nous retrouvons des cinétiques d'ordre 1 décrivant bien l'élimination par un détergent alcalin de souillures organiques de surfaces en acier inoxydable. Beaucoup plus récemment Grant *et al.* (1996) ont développé un modèle cinétique d'élimination du phosphate de calcium en se basant sur l'équation de Jennings. Pour des souillures du type laitières à base essentiellement de protéines et dans le cadre d'un nettoyage alcalin, Gallot-Lavallée *et al.* (1988) ont proposé un modèle cinétique composé de deux équations successives : une cinétique d'ordre zéro pour l'action chimique sur les souillures de lait (effet chimique pur), suivie d'une cinétique d'ordre 1 comme Jennings pour décrire l'action mécanique du fluide agissant uniquement sur l'encrassement modifié par les ions hydroxydes.

Les courbes log-linéaires sont en fait un cas particulier en microbiologie prévisionnelle pour décrire les courbes de survie. Concave, convexe, sigmoïdale, biphasique ou simple destruction log-linéaire. Une même espèce bactérienne présente différentes formes de courbes en fonction des conditions expérimentales, selon que l'on fasse référence aux conditions de stress ou aux conditions de préparation de l'inoculum (figure 2). De nombreux modèles ont été développés pour décrire un ou plusieurs types de courbes de survie. Dans le cas du traitement thermique de populations microbiennes et particulièrement dans le cas de spores bactériennes, les allures des courbes de survie peuvent être relativement indépendantes des facteurs environnementaux sans pour autant être linéaires (Peleg *et al.*, 2001 ; Fernandez *et al.*, 2002 ; Mafart *et al.*, 2002 ; van Boekel, 2002; Couvert *et al.*, 2005). Dans ce cas, un modèle permettant de décrire un seul type de courbe peut être appliqué. Mais le problème est plus difficile à résoudre si l'allure des courbes d'inactivation varie en fonction de l'intensité du stress appliqué. Dans le cadre de traitement thermique, il s'agit le plus fréquemment de traitements à faible température et de cellules végétatives (Geeraerd *et al.*, 2000).

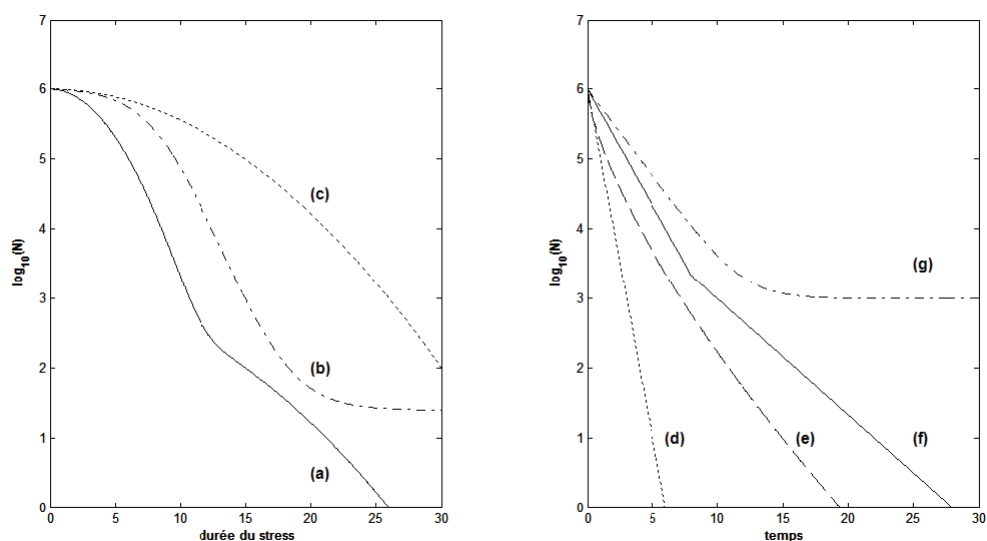


Figure II.3 : Différentes formes de courbes d'inactivation : biphasique avec épaulement (a), sigmoïdale (b), convexe (c), linéaire (d), concave (e), biphasique (f), linéaire avec traînée (g)

Dans le cadre de l'inactivation non thermique, le phénomène de non linéarité des courbes de survie est amplifié, et il est ainsi rare de trouver une courbe de survie log-linéaire. Comme nous l'avons vu précédemment l'intensité du stress, mais aussi l'adaptation des cellules, jouent sur l'allure des courbes de survie. La non linéarité des courbes de survie s'explique par la différence de résistance et de capacité d'adaptation au stress entre les individus (Booth, 2002; Brehm-Stecher & Johnson, 2004).

La non linéarité des courbes de survie est donc un phénomène tout à fait normal, lié par exemple à la plus ou moins grande résistance à une molécule chimique. La construction des modèles peut s'effectuer selon deux approches. L'approche empirique et l'approche mécanistique. Les modèles empiriques décrivent simplement les données sans prendre en compte les phénomènes provoquant la réponse observée. Les modèles mécanistes sont développés à partir de théories, d'hypothèses et permettent d'expliquer la réponse à modéliser par l'action de phénomènes physiques, biologiques et/ou chimiques. L'avantage d'une approche mécanistique est d'avoir des bases plus solides pour d'éventuels développements ou expansions du modèle (Ross & Dalgaard, 2003). En Microbiologie prévisionnelle, la grande majorité des modèles ne sont pas purement empiriques ou purement mécanistiques. Nous utiliserons le terme « mécanistique » par opposition au terme « empirique ».

De nombreux modèles ont été employés pour décrire l'inactivation due à un stress non thermique. Le plus souvent, il s'agit de modèles antérieurement proposés dans le cadre de traitement thermique et dont les applications ont été élargies aux autres stress. Mais certains modèles ont été spécialement développés pour l'inactivation non thermique (Buchanan *et al.*, 1993; Whiting, 1993; Membre *et al.*, 1997b; Breand, 1998; Xiong *et al.*, 1999). Tous les modèles ont été confrontés et critiqués en fonction des théories ou des hypothèses sur lesquelles ils reposent, mais aussi en fonction de leur parcimonie, de leur performance d'ajustement, de l'interprétation physique, chimique ou biologique de leurs paramètres, de leur capacité à décrire les différentes formes de courbes de survie, de leur capacité à être utilisé sous forme dynamique et donc à décrire le comportement microbien en conditions environnementales variables (Cerf, 1977; Xiong *et al.*, 1999; Geeraerd *et al.*, 2000; Valdramidis *et al.*, 2004; Albert & Mafart, 2005). Nous présentons quelques uns des modèles dans le tableau 3.

Dans le chapitre consacré à l'étude cinétique d'élimination de biofilms nous nous proposons de reprendre la démarche proposée en microbiologie prévisionnelle afin de modéliser les courbes cinétiques de décrochement des bactéries au sein des biofilms dont les profils sont largement non « log-linéaires ».

Tableau II.3 : Modèles d'inactivation bactériennes.

Modèle	Application	Références
$\log_{10}(N(t)) = (1 + \log_{10}(N_0)) - e^{kt}$ <p>k : vitesse d'inactivation (II.3)</p>	inactivation de <i>Salmonella typhimurium</i> en mayonnaise.	Membré <i>et al.</i> (1997b)
$\frac{N(t)}{N_0} = e^{-\left(\frac{t}{a}\right)^\beta}$ <p>(II.4)</p> <p>a : paramètre d'échelle; β : paramètre de forme</p>	inactivation bactérienne due à un stress thermique.	Peleg & Cole (1998) Fernandez <i>et al.</i> (1999)
$N(t) = (N - N_{res}) 10^{-\left(\frac{t}{a}\right)^\beta} + N_{res}$ <p>N_{res} concentration résiduelle de microorganismes (II.5)</p>	inactivation non thermique sous deux différentes formes.	Mafart <i>et al.</i> (2002) Albert & Mafart. (2005) Geeraerd <i>et al.</i> (2000)
$\frac{dN}{dt} = -k_{max} \cdot N \left(\frac{1}{1 + C_c} \right) \left(1 - \frac{N_{res}}{N} \right)$ <p>N : concentration bactériennes k_{max} : taux de mortalité ; N_{res} : résiduel de la population en fin de traitement ; C_c : état physiologique des cellules (II.6)</p>	modèles non linéaires permettant de décrire les courbes de survie non log-linéaire qui apparaissent souvent dans le cadre de traitements thermiques modérés.	Geeraerd <i>et al.</i> (2000)
$N(t) = (N_0) \left(f \cdot e^{-k_{max1}t} + (1-f) \cdot e^{-k_{max2}t} \right)$ <p>f : proportion au sein de la population totale de la population majoritaire ; k_{max1} : taux de destruction de la sous population ; k_{max2} : taux de destruction de la population minoritaire (II.7)</p>	Ce modèle repose sur l'existence de deux fractions de résistances différentes au stress au sein de la population. L'inactivation de chaque sous-population suit une courbe de survie décrite par un modèle d'ordre un.	Geeraerd <i>et al.</i> (2000) Valdramidis <i>et al.</i> (2004)

MATERIELS
ET
METHODES

CHAPITRE III : Matériaux utilisé en industries agro-alimentaire

Résumé :

Dans ce chapitre III nous nous intéressons aux propriétés des matériaux couramment utilisés dans les agro industries. Une attention particulière sera accordée à l'acier inoxydable que nous avons largement utilisé au cours de notre étude. Aussi nous nous intéresserons aux paramètres du matériau qui influencent l'adhésion bactérienne.

III.1. Introduction

La conception des matériaux utilisés pour la fabrication des aliments destinés à la consommation doit respecter des règles d'alimentarité. Dans les industries agro alimentaires la facilité à l'hygiène de ces matériaux est également d'une grande importance afin de limiter la contamination des aliments en contact. Ces matériaux doivent supporter des conditions environnementales potentiellement difficiles comme les fortes pressions, de fortes concentrations de produits alcalins et acides, des températures élevées, tout en restant facilement nettoyables. Les matériaux utilisés pour la production des aliments doivent présenter des qualités telles que : résister à la corrosion, être non toxique, être stable mécaniquement et avoir une finition de surface qui n'est pas affectée défavorablement par le processus de fabrication. Toute fois, ces dernières décennies ont vu naître des avancées technologiques importantes dans le domaine agro alimentaire. Nous pouvons citer entre autres : la modification possible des propriétés physicochimiques de ces matériaux et l'apparition de technologies de transformation plus douces (utilisation de températures plus faibles). Malgré ces innovations, l'encrassement des surfaces en contact avec les aliments reste un phénomène permanent. Plusieurs études ont été menées pour élucider l'importance des paramètres du support qui influencent l'adhésion bactérienne à ces surfaces inertes (Weienecek *et al.*, 1991 ; Harf *et al.*, 1991).

Par ailleurs, l'adhésion bactérienne à une surface n'est pas uniquement liée aux propriétés de surface comme nous l'avons largement décrit précédemment. La présence de souillure sur une surface peut être liée aux conditions environnementales du site de transformation

(personnels, aérosol), à la conception de l'usine de production et aux conditions de production.

Dans ce chapitre nous ferons un bref bilan sur les matériaux communément utilisés dans les entreprises alimentaires ; un accent sera mis sur les propriétés de ces matériaux.

III.2. Les matériaux en agroalimentaires

Une variété de matériaux est utilisée dans la construction des équipements en industries agroalimentaires. Ces matériaux varient selon leur exploitabilité, leur compatibilité, et selon les caractéristiques de la conception sanitaire. En fonction des différentes applications, les équipements de fabrication alimentaire sont construits avec de nombreux matériaux différents auxquels les bactéries peuvent adhérer. Nous pouvons citer les plus courants comme l'acier inoxydable, les élastomères et les plastiques.

Des matériaux non-métalliques tels que les élastomères (rubbers) et les plastiques sont en utilisation croissante dans les industries alimentaires et dans les industries de boissons pour des applications spécifiques. Ces matériaux sont par exemple utilisés pour fabriquer des courroies de convoyeurs, des containers, des tapis roulants, des planches de découpage. Des matériaux en plastiques tel que le PMMA sont souvent rencontrés dans des installations de production laitière (Wildbrett & Sauerer, 1989). D'autres matériaux plastiques tels que : l'EPDM (monomère d'éthylène-propylène diène), le NBR (connu sous le nom de Buna-N), le silicone, le fluoro-élastomère (viton), l'EPDM et le NBR sont fréquemment utilisés dans les industries laitières en tant que matériaux des joints d'étanchéité. Le PTFE (polytetrafluoroéthylène) ne peut cependant être utilisé car il est poreux, moins résistant et perméable (EHEDG, 1993).

Les installations peuvent avoir de grandes surfaces disponibles convenant à une colonisation rapide. Le degré d'hydrophobicité des surfaces a souvent été cité comme un facteur déterminant dans l'adhésion bactérienne. (Sinde & Carballo, 2000 ; Teixeira *et al.*, 2005) suggèrent que, en solution aqueuse, l'adhésion est favorisée par les surfaces hydrophobes. Le Téflon®, matériau très hydrophobe est souvent utilisé comme un revêtement « non-adhésif ». Malgré cette caractéristique qui lui est attribué, la fixation de Salmonella et de Listeria s'est avérée élevée (Sinde & Carballo, 2000). Les travaux de Brugnoli *et al.*, 2007 ont montré que la fixation initiale sur l'acier inoxydable de quatre

espèces de levures isolées à partir d'un procédé de fabrication de jus de pomme était gouvernée par l'hydrophobicité de la surface des cellules.

III.2.1. Acier inoxydable

Des matériaux communément utilisés des les industries de transformations alimentaires (systèmes ouverts comme les ateliers ou fermés comme les lignes de transformation), l'acier inoxydable demeure le matériel de choix, parce que, en plus d'être non seulement résistant à la corrosion en milieux alcalin et acide, il est extrêmement hygiénique (Boulangé-Petermann *et al.*, 1997). Depuis son invention il y a plus d'un siècle par Monnartz (Monnartz, 1911) ce matériau connaît un taux d'accroissement de plus de 5% par an. L'acier inoxydable est un alliage ferrique contenant environ 1,2% de carbone et au minimum 10,5% de chrome. La surface est recouverte par une couche passive contenant des oxydes de chrome protégeant efficacement contre la corrosion. Cependant, il est recommandé que l'acier inoxydable soit régulièrement passivé (utilisation de l'acide nitrique ou d'agent oxydant à forte concentration), le film passif assurant la protection de la surface contre la corrosion. L'évolution de ce film passif joue un rôle sur l'hygiène de l'acier comme l'ont montré récemment Jullien *et al.* (2008).

L'acier inoxydable est disponible sous diverses nuances (Ferritique, Austénitique 304 L, 316 L...). Le choix de ce matériau est dicté par l'utilisation prévue (tube, équipement complexe, soudure) et aussi le procédé (températures, produits corrosifs). Ainsi, en fonction de la teneur en chrome, et l'addition de certains autres éléments tels que le molybdène ou le nickel, tout ceci confère à cet alliage des caractéristiques spécifiques, tel que l'augmentation de la résistance à la corrosion, la facilité à subir des déformations et la facilité de soudure.

L'acier inoxydable austénitique (contenant du nickel) est l'alliage très communément utilisé en industrie alimentaire et de boisson, dans les installations fermées comme ouvertes. La série 300 (fer-chrome-nickel) est recommandée par l'Institut Américain du fer et de l'acier (AISI) pour les surfaces en contact avec les aliments. Les aciers austénitiques sont largement utilisés non seulement en biotechnologie, en pharmacie et en industrie agroalimentaire mais aussi comme implants dans le domaine médical (Sundgren *et al.*, 1985 ; Hayashi *et al.*, 1989). Ces aciers sont généralement choisis pour leur prix abordable, leur bonne résistance mécanique, leur résistance accrue à la corrosion, leur longévité conséquente mais également leur forte résistance à l'abrasion (Holah & Thorpe, 1990).

L'alliage le plus commun est l'AISI 304 (mais principalement AISI 304L modifié pour la soudure), contenant du chrome (16-18%) et du nickel (8-13%) et durables dans des applications alimentaires classiques tel que les industries de transformation laitière et les industries de la boisson.

Avec environ 2% de molybdène (le molybdène est absent du type 304), le type AISI 316 (316L) est la seconde classe d'acier communément utilisé dans les industries alimentaires. Ce matériau a une résistance accrue à la corrosion en milieu chloré et en présence de dioxyde de soufre et de sel. A part ceci ces deux types de matériaux sont identiques en tous points.

L'acier inoxydable dont les propriétés font un matériau de choix pour les industries agroalimentaires conserve ses qualités « hygiéniques » au fil du temps (Stevens & Holah, 1993).

III.2.2. Finitions de l'acier inoxydable.

Les classes observées sont fonction des différentes finitions de surfaces. Selon les traitements auxquels les aciers inoxydables sont soumis, soit pendant ou après le processus de production. En Europe, deux types de finition sont communément utilisées dans les industries alimentaires et les industries de boisson. Ce sont : le non-poli 2B, dont le laminage final est réalisé à froid, recuit et décapé et le recuit brillant 2R (BA), dont le laminage final à est aussi réalisé à froid, avec un recuit final réalisé sous atmosphère contrôlée. Leur rugosité moyenne Ra est d'environ 0,5 μm (Avesta Sheffield). Cependant, pour la même finition, la topographie de surface dépend de l'épaisseur des couches de l'acier inoxydable. Par ailleurs, aucune spécification particulière n'est proposée concernant l'énergie libre de surface de surface pour les surfaces en contacts avec les aliments. L'acier inoxydable employé communément dans le secteur alimentaire a une énergie de surface de l'ordre de 200 mJ.m^{-2} , les polymères et les matériaux organiques sont caractérisés par une surface d'énergie plus basse de l'ordre de 100 mJ.m^{-2} .

Cependant, cette classification est plus complexe qu'il ne paraît, car les matériaux font souvent preuve d'une grande hétérogénéité de surface identifiable non seulement à l'échelle micro mais également nanoscopique pouvant avoir un effet sur le statut hygiénique des surfaces. Par exemple, l'acier inoxydable fini 2B, est composé de grains et de

grains liés, rendant ce matériau non hétérogène et cela en termes de topographie et d'énergie libre de surface (Geesey *et al.*, 1996).

III.3. Propriétés physico-chimiques des matériaux

Beaucoup d'études ont été réalisées sur la relation entre l'adhésion bactérienne et les propriétés physico-chimiques des surfaces inertes, à savoir les interactions acido-basiques, interactions électrostatiques et l'énergie libre de surface.

III.3.1. L'hydrophobicité :

Une analyse thermodynamique (Duncan-Hewitt, 1990) montre que les interactions hydrophobes sont spontanées, très dépendantes de la température et thermodynamiquement favorables. Toutefois, cette description de l'effet hydrophobe s'avère très peu satisfaisante. Certains suggèrent que l'hydrophobicité est fonction des liaisons hydrogène (Duncan-Hewitt, 1990). La fixation des bactéries sur une surface est thermodynamiquement favorable si l'énergie libre totale d'adhésion est négative (Teixeira *et al.*, 2005). Cependant, il est peu probable que l'effet hydrophobe seul puisse prédire l'attachement des bactéries aux surfaces. Cela s'expliquant par la forte dépendance des bactéries à la température, au pH, aux électrolytes dans le milieu de suspension qui compliquent fortement le système. Néanmoins, il a souvent été difficile de démontrer une relation simple entre les propriétés de surface des matériaux, des cellules bactériennes et l'adhésion. Sinde & Carballo (2000) n'obtiennent aucune corrélation entre la quantité bactérienne adhérente et l'énergie libre de surface ou simplement l'angle de contact. Flint *et al.*, (1997b), n'ont trouvé aucune relation statistiquement significative entre l'hydrophobicité et l'adhésion des souches de streptocoques thermo-tolérants. Toutefois, ces auteurs ont observé une fixation préférentielle des bactéries sur l'acier inoxydable et sur le zinc comparativement à d'autres matériaux comme le verre. Plus récemment ces mêmes auteurs (Flint *et al.*, 2000) observent que les bactéries étaient plus adhérentes à l'acier inoxydable 316 L, légèrement plus hydrophobe dans leur étude que l'acier inoxydable 304 L. Zhao *et al.* (2005) ont calculé les valeurs de l'énergie libre de surface, pour une force d'adhésion bactérienne minimale, à l'aide de la théorie Derjaguin Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) étendue. Dans ces expériences, l'adhésion bactérienne s'est avérée faible lorsque les composants apolaires de Lifshitz–van der Waals de l'énergie libre surface (dans ce cas un revêtement de surface) étaient d'environ $25,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. L'explication possible de la difficulté à relier quantitativement les propriétés de surface et la quantité de bactéries adhérentes est

que l'énergie libre de surface est plus liée à la force de liaison qu'au nombre de bactéries attachés par unité de surface (Sinde & Carballo, 2000).

Bien que les propriétés de surface contribuent sans aucun doute à la phase initiale de l'adhésion, le processus d'adhésion lui-même semble stimuler la synthèse des EPS, qui contribue largement à la formation de biofilm (Davies & Geesey, 1995 ; Koutchma & O'Toole, 2000). Vraisemblablement, les polysaccharides et tous autres exsudats bactériens adhèrent à la surface conformément aux dispositions de la relation de l'énergie de surface (Kirtley & McGuire, 1989). Par ailleurs le conditionnement de surface induit par ces molécules modifie les propriétés de la surface et donc l'adhésion.

Duncan-Hewitt (1990) conclut qu'il est très difficile d'évaluer les résultats des essais d'adhésion uniquement sur la base de l'hydrophobicité, compte tenu de la complexité des interactions au sein de ces systèmes interfaciaux ».

III.3.2. Topographie de surface

La relation entre l'attachement des bactéries et de la topographie de surface a été étudiée par intermittence depuis 45 ans (Flint *et al.*, 1997a), et les opinions sur l' effet de la rugosité de surface sur la fixation bactérienne et la croissance bactérienne varient très largement. La qualité hygiénique des produits alimentaires est étroitement liée au degré de nettoyabilité des équipements des lignes de production et la rugosité de l'acier inoxydable est considéré comme un facteur primordial dans la formation et le décrochement des biofilms (Leclercq-perlat & Lalande 1994 ; Wirtanen *et al.*, 1997). Selon une étude réalisée par Coquet et al. (2002, sur deux souches de *Yersinia* étudiées, une forte corrélation existait entre l'importance de la rugosité (Ra) du matériau support et l'adhésion. Mais, ces résultats contrastent avec ceux de Flint *et al.* (2000) dans lequel ils ont constaté que pour des valeurs de Ra comprise entre 0,5 et 3,3 μm , il existait peu de corrélation entre la fixation de streptocoques thermorésistants à l'acier inoxydable. Whitehead & Verran (2007) ont montré que la rétention de cellules bactériennes après un trempage ou une pulvérisation sur des surfaces en acier inoxydable recouvert de titane de différentes finitions était clairement due à la topographie. Soit la topographie gouverne la rétention soit le mode d'application combiné à l'organisation des motifs de surface gouverne le phénomène de rétention. Il convient de noter que les conditions d'essais proposées dans ces différentes études sont extrêmement variées. Ainsi, Flint *et al.* (2000) ont mesuré l'adhésion après 30 minutes par

impédancemétrie (bio-impédance), Coquet *et al.* (2002) ont incubé les échantillons entre 3-9 h avant de récupérer les cellules bactériennes par sonication, tandis que Whitehead & Verran (2007) ont séché les échantillons de substrat immédiatement après l'application de la culture et puis ils ont visualisé les cellules adhérentes par microscopie à épifluorescence.

Néanmoins, les normes exigent un degré particulier de finition de surface pour les matériaux alimentaires ou de transformation de produits laitiers comme par exemple la norme allemande DIN, 1992 qui spécifie que la rugosité moyenne de surface R_a ne devrait pas excéder 1.0 μm . La nettoyabilité des surfaces est souvent présentée comme une fonction décroissante en fonction de la rugosité de surface (Flint *et al.*, 2000). Parmi les auteurs qui ont traité spécifiquement le sujet, nous pouvons citer Holah & Thorpe (1990) et Harf *et al.* (1991). Ces auteurs montrent que plus la rugosité augmente plus l'adhésion bactérienne est corrélée à une plus grande difficulté au nettoyage.

La caractérisation de la rugosité de surface peut être effectuée via plusieurs paramètres. Deux types de paramètres, décrivant une mesure en deux dimensions, sont utilisés pour décrire la nettoyabilité des équipements. Le premier paramètre est la rugosité moyenne (R_a), souvent donnée en μm , qui correspond à la moyenne arithmétique de la valeur absolue des ordonnées du profil de rugosité ($Z(x)$), ce profil correspond à la topographie réelle de la surface (ISO 4288, 1998).

$$R_a = \frac{1}{l_s} \int_0^{l_s} |Z(x)| dx \quad (\text{III.1})$$

Avec l_s la longueur de l'échantillon à caractériser. Une valeur de R_a inférieure ou égale à 0,8 μm a été fixée par la législation pour les installations de l'industrie laitière (ISO 4288, 1998) et en général pour toutes les surfaces en contact avec les aliments (EHEDG, 1993). Bien qu'il demeure le plus utilisé, le facteur R_a ne permet pas de caractériser spécifiquement la topographie d'une surface comme par exemple la présence d'éraflures ou de porosités.

Pour cette raison, un deuxième paramètre, appelé profondeur du profil, P_t (μm) ou rugosité maximale R_z a été utilisé. Il correspond à la distance entre le plus haut pic et le plus bas niveau du profil « P » également obtenu à partir du profil de la topographie réelle de la surface (ISO 4288, 1998).

Actuellement, d'autres méthodes de visualisation en trois dimensions de la topographie de surface sont utilisées, comme le microscope électronique à balayage (Scanning Electron Microscopy (SEM)) et le microscope à force atomique (Atomic Force

Microscopy (AFM)) qui peut permettre jusqu'à une caractérisation nanométrique de la topographie (De Chiffre, 1999 ; Stout & Blunt, 1995). Nous pouvons également citer le crayon optique (triangulation laser) et la microscopie interférométrique (*PSM : Microscopie à Saut de Phase*. - *CPM : Microscopie à sonde optique de faible cohérence*).

Afin de déterminer une valeur minimale de rugosité qui constitue un seuil en deçà duquel les bactéries n'adhèrent pas, des surfaces de rugosité inférieure à la valeur de référence 0,8 μm ont été testées par plusieurs auteurs. Barnes *et al.* (1999) ont testé l'effet sur de l'acier inoxydable avec des bactéries en suspension dans le lait. Pour des valeurs de Ra qui varient entre 0,035 μm et 0,4 μm , aucune différence significative n'a été observée. Le même résultat a été observé lors d'études effectuées sur des surfaces de rugosité Ra variant entre 0,5 μm et 3,3 μm (Flint *et al.*, 1997).

Brouillaud-Delattre (1993) a également montré que la rugosité n'est pas le facteur prédominant dans le développement d'un biofilm laitier en comparant des surfaces d'acier rugueuses abrasées et des surfaces neuves plus lisses.

Il serait plus logique que la facilité à l'élimination de bactéries soient liées à la rugosité mais Boyd *et al.*, (2001) ne voient pas de lien entre la valeur du Ra et l'arrachement bactérien mais montrent l'importance des défauts de surface comme nous pouvons l'observer sur certaines soudures. Ce résultat a également été observé par Hilbert *et al.*, (2003). Faille *et al.* (2002) avait montré que deux surfaces de rugosités identiques (1,15 mm) présentaient des facilités au nettoyage opposées au sein d'un plan d'expérience mettant en œuvre divers finis de surface et des spores de *Bacillus*. Le rôle de l'organisation de la topographie de la surface apparaissait comme particulièrement important et ces auteurs ont proposé deux autres paramètres que sont les Rvk (valeur moyenne des creux les plus profonds) et Rpk (valeur moyenne des indentations ou pics les plus élevés). En effet, les paramètres associés au taux de portance définissent précisément la forme du profil de rugosité en calculant le pourcentage de matière que l'on observe à différents niveaux. Ce pourcentage est reporté sur une courbe spécifique (appelée courbe d'Abbott-Firestone) qui définit la forme réelle du profil. Les paramètres Rpk, Rk et Rvk qui permettent de décrire la courbe sont adoptés en 1997 dans les normes ISO 13565.

III.3.3. Propriétés énergétiques de la surface inerte

Les caractéristiques physico-chimiques des surfaces solides dans l'industrie de la transformation des aliments sont suspectées pour influencer significativement sur la formation

de biofilms principalement via l'attachement de la cellule initiale : Bryers (1987) ont montré que l'attachement des bactéries dépend de la tension de surface critique de la surface solide. Une énergie libre élevée et la présence d'eau promeuvent l'adhésion bactérienne (Boulanger-Petermann *et al.*, 1993). Bendinger *et al.*, (1993) observent une adhésion préférentielle des cellules bactériennes aux surfaces plutôt hydrophiles (acier inoxydable, verre, etc.) qu'aux surfaces hydrophobes (caoutchouc Buna-N et autres matières plastiques). En revanche, Baker (1984) n'avait trouvé aucune différence au cours de l'adhésion de cellules de bactéries d'eau douce sur des lames de verre hydrophile et des boîtes de Pétri en polystyrène. En outre, Bos *et al.* (2000) ont conclu qu'une colonisation bactérienne se produit préférentiellement dans la zone hydrophile d'une interface hydrophile-hydrophobe de la surface de l'acier inoxydable. Même si des résultats contradictoires ont été observés dans les différents systèmes, les interactions hydrophobes se produisent apparemment entre la surface de la cellule et le substrat. Si l'acier est considéré comme un matériau stable dans le temps et certainement très hygiénique, il est constaté que les matériaux polymères vieillissent au cours du temps d'utilisation avec apparition de discontinuités de surfaces (micro-crevasses) servant d'abris aux bactéries contre l'action mécanique des écoulements par exemple (Characklis & Hector, A.,1992). Les produits nettoyants ou désinfectants peuvent modifier les propriétés de surfaces des matériaux (Boulanger-Petermann *et al.*, 1994) et par conséquent l'adhésion bactérienne sur ces surfaces.

Chapitre IV : Matériels biologiques et équipements utilisés

IV.1. Souches bactériennes

IV.1.1. Caractéristique des souches étudiées

Les souches de *Bacillus* utilisées sont présentées dans le tableau IV.1. En plus de la souche type, les autres souches ont été isolées soit de l'environnement (*B. cereus* 5832), de chaînes de transformation en industrie laitière (*B. cereus* CUETM 98/4), d'ateliers de fabrication de pâtes (CCL9), où encore de patients souffrant de symptômes diarrhéiques (D22). Ces souches ont été sélectionnées sur des critères de taux et de rapidité de sporulation, de thermo et de chimio-résistance, de propriétés de surface des spores et de leur capacité d'adhésion à des surfaces solides (Faille *et al.*, 2010). Cette dernière caractéristique est liée en grande partie à l'existence d'un exosporium amorphe qui enveloppe la spore (Faille *et al.*, 2010).

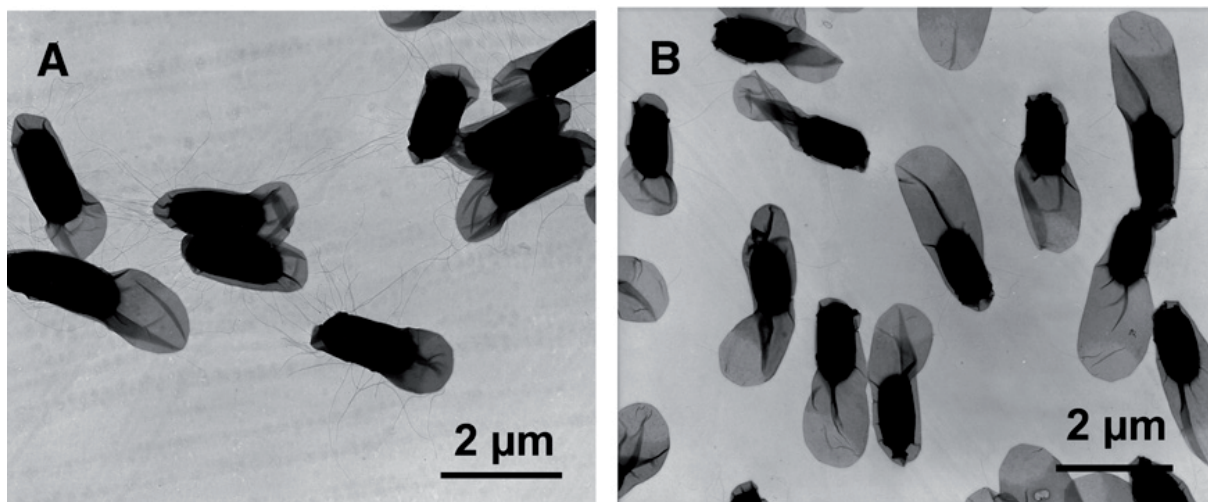


Figure IV.1 : Observation en microscopie électronique par transmission des spores de *B. cereus* 98/4 et *B. cereus* 5832 d'après Faille *et al.* (2010)

Par ailleurs, ces souches ont été sélectionnées pour leur capacité à former des biofilms (Lequette *et al.*, 2010).

Une autre souche bactérienne *Pseudomonas fluorescens* (D₃ 276) considérée non pathogène, mais communément isolée de lignes de production laitière a fait l'objet d'une partie de notre étude. Cette souche provenant de l'ANSES a été choisie pour sa capacité à favoriser

l'implantation de bactéries pathogènes et en particulier de *Listeria monocytogenes* (Carpentier & Chassaing, 2004).

Tableau IV.1 : Caractéristique des souches étudiées

Espèces	Souches	Origines
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	Souche type
	5832	Souche environnementale
	D22	Souche clinique (diarrhéique)
	CUETUM 98/4	Collection de l'unité d'Eco-toxicologie Microbienne de Villeneuve d'Ascq, laiterie
<i>B. Sp</i>	CCL 9	Site de fabrication de pâtes
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D ₃ 276	laiterie

Afin d'éviter toute mutation de la souche par de nombreux repiquages, un stock de culture est réalisé sur gélose nutritive. Ce stock est conservé en chambre froide à la température de 4°C afin de stopper la croissance.

IV.1.2. Préparation de spores

Après deux repiquages sur gélose nutritive inclinée incubée à 30°C pendant 24 h, 100 ml de bouillon nutritif sont ensemencés et incubés à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 550 nm (DO550) de 1,2.

La biomasse est ensuite récoltée par centrifugation à 1200 **g**, 30°C pendant 10 min puis reprise dans un minimum de milieu. 200 microlitres de cette suspension vont ensuite ensemer des boites de gélose Spo8 (sporulation solide) ou des bouillons de milieu Spo8 (sporulation liquide). Ce milieu assure un haut niveau de sporulation (Faille *et al.*, 1997). Les boites ou les bouillons sous agitation sont ensuite incubés à 30 °C pour les conditions optimales ou à 20 et 40 °C de 5 à 10 jours jusqu'à obtention de 95% de spores mûres (vérification par coloration des cellules au vert de malachite). Les spores sont récoltées par grattage de la surface des boites ou par centrifugation à 1200 **g**, 10 min à 4°C. Enfin, les spores subissent 5 lavages successifs à l'eau ultra-pure stérile, et sont stockées à 4°C pour

éviter leur germination. Les spores récoltées ne sont utilisées que 10 jours après afin d'attendre la stabilisation de leurs propriétés de surface.

IV.1.3. Préparation de la suspension de mère.

Une préculture est réalisée en bouillon nutritif TSB (voir Annexe 1). Une colonie de bactérie est prélevée puis ajoutée à 50 ml de cette suspension et incubée à 30°C sous agitation pendant une nuit. Ainsi, pour tous les essais de formation de biofilm, la concentration de la solution de travail a été réalisée à une densité optique de 550 nm (DO_{550}) à 0.01. Cette concentration est ajustée selon le volume de la solution de travail.

IV.1.4. Milieux nutritifs utilisés

Deux milieux de suspension ont été utilisés lors de nos études, du lait et du TSB (Trypsic Soy Broth(Biokar)), tous deux dilués au dixième. La formation du biofilm à *Pseudomonas fluorescens* est réalisée dans du lait écrémé (Cora France –Villeneuve d'Ascq) et ceux à *B. cereus* ont été développés dans du TSB 1/10.

Nous avons choisi un milieu alimentaire dilué pour nous rapprocher de conditions environnementales potentielles sur site industriel à savoir mauvais rinçage et présence d'éléments nutritifs issus de l'aliment transformé. La modification des propriétés de surface de plusieurs matériaux due à la présence de lait a été montrée par de nombreux auteurs. Les macromolécules présentes dans le lait s'adsorbent sur les surfaces support (Speers & Glimour, 1985 ; Husmark & Rönner, 1993 ; Helke *et al.*, 1993).

IV.2. Matériels

IV.2.1. Conduites en acier inoxydable

L'étude du décrochement de contaminants bactériens dans le temps a nécessité l'utilisation d'une série de 36 tubes cylindriques. Ces tubes sans soudure de type 304 L (finis 2B, rugosité moyenne $0,3 \cdot 10^6 \mu\text{m}$ mesurée sur 6 longueurs d'évaluation à l'aide d'un rugosimètre Mahr XR20) ont subi avant utilisation un conditionnement de leur surface interne (Annexe 2). Ce type d'acier est couramment utilisé en industrie alimentaire pour sa résistance aux produits de nettoyage et de désinfection. Les tubes font $20 \cdot 10^{-2}$ m de longueur et $2,3 \cdot 10^{-2}$ m de diamètre. Après chaque essai, ils subissent un nettoyage de type

industriel sur la plate-forme de NEP avec de la soude (passage au détergent NaOH 2% à 80°C), puis rinçage à l'eau. Ceci permet de nettoyer les tubes et de retrouver un état de surface similaire avant chaque manipulation.

Les tubes associés trois par trois sont placés sur un tourniquet conçu à façon au laboratoire de manière à être placé dans une étuve où la température est maintenue constante. Le tourniquet est composé de huit paires d'accroches fixées sur un axe. Le diamètre des accroches est équivalent au diamètre extérieur des tubes. Il comprend un moteur et deux poulies (l'une des poulies est fixée sur l'axe portant les accroches et la seconde sur le moteur) reliées par une courroie. La rotation du moteur entraîne l'axe. La vitesse de rotation du moteur réglable a été choisie constante à 8 tours par min. L'objectif est de favoriser une installation homogène en évitant le phénomène de sédimentation sur la partie basse des tubulures. La photographie du système est présentée figure IV-2.

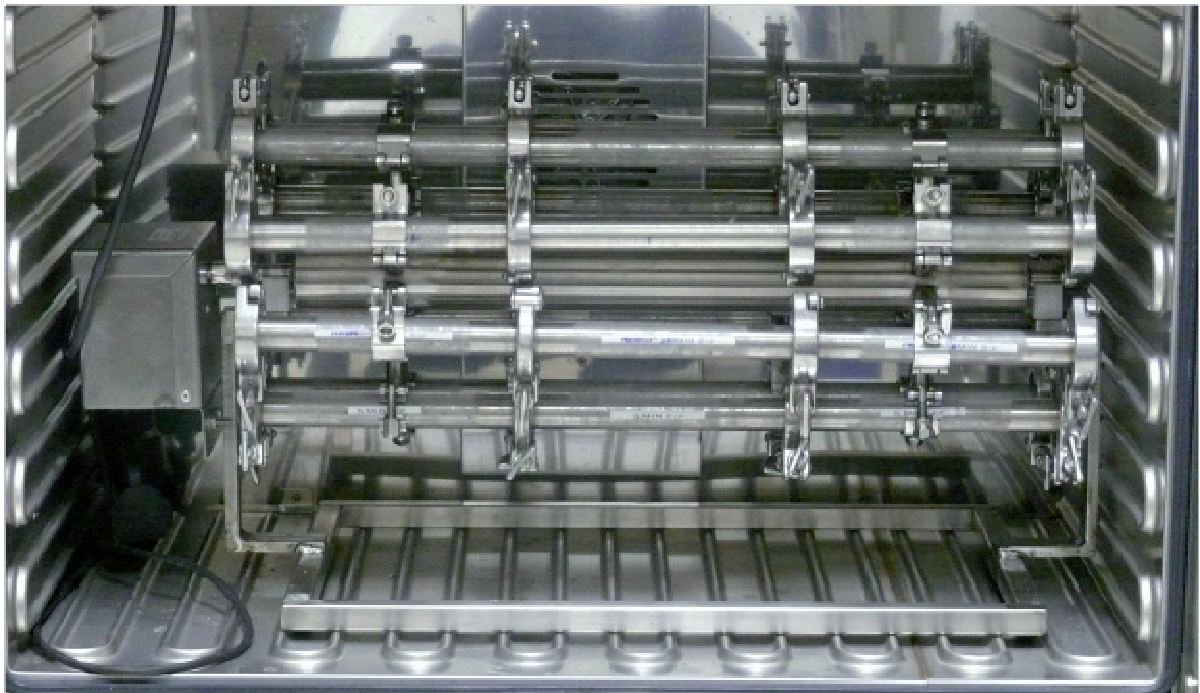


Figure IV.2 : Photographie du tourniquet utilisé pour la formation des biofilms de *P. fluorescens*

IV.2.2. Coupons en acier inoxydable

Des coupons en acier inoxydable de type 316L avec une rugosité moyenne de $0,3 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}$ (6 mesures par échantillon), de finition 2B recuit brillant forme rectangulaire sont découpés pour être insérés dans des tubes de section carrée (Figure IV.3.(1-2)). Ils ont une longueur de $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ et une largeur de $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}$ pour une épaisseur de $1 \cdot 10^{-3} \text{ m}$. Comme illustré

dans la figure IV.3 : (3), chaque tube carré ne contient que 5 coupons. Toutefois sur les 5 coupons, les deux coupons à chaque extrémité ne sont pas analysés, la contamination résiduelle ayant potentiellement intégré l'effet de perturbations liées aux raccordements tubes à tubes (présence d'un joint polymère *a priori* n'entraînant pas de défauts d'alignement).

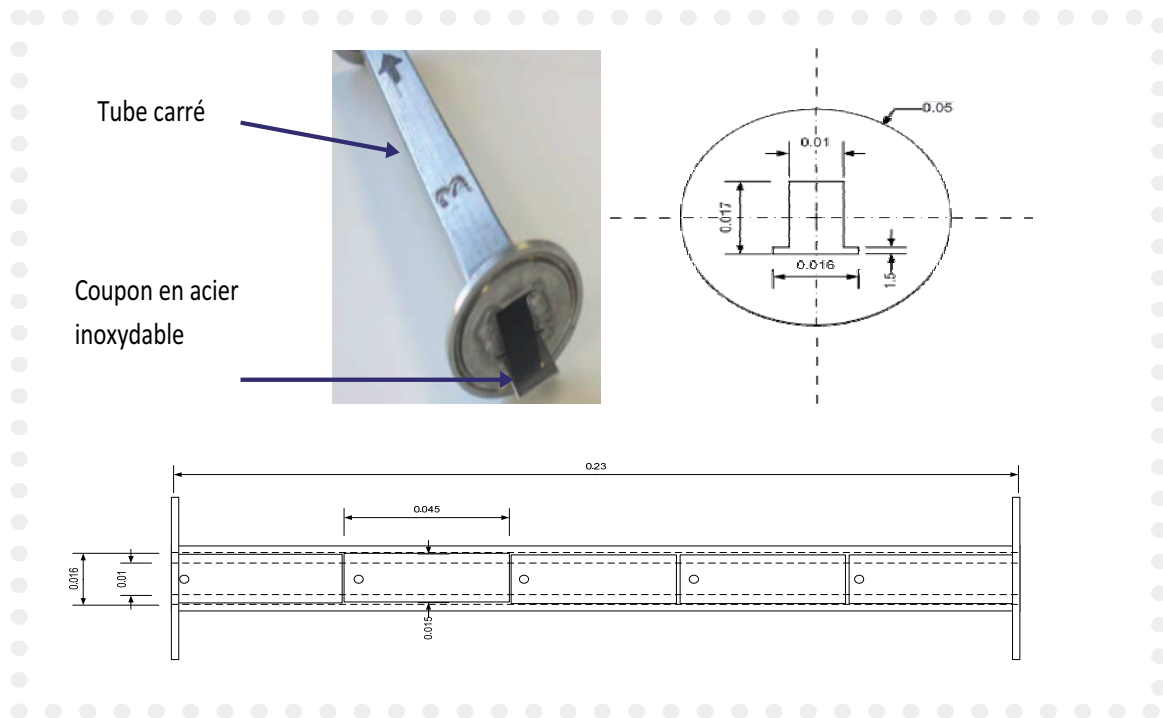


Figure IV.3 : Schématisation des coupons en acier inoxydable et présentation des tubes supports.

IV.2.3. Vanne bidirectionnelle 2x2 voies

Une vanne en acier inoxydable bidirectionnelle (PG 7, Pierre Guérin, France) (AISI 316 L), largement présente dans les lignes de la transformation des aliments, a été utilisée pour évaluer la réadhésion dans le cas des équipements complexes (Figure IV. 3). Cette vanne comprend une partie supérieure et une partie inférieure, ces deux parties sont séparées par une chambre intermédiaire fermée par deux disques associés à des joints. Les parties supérieures et inférieures sont reliées au circuit externe par des conduites coudées. Les diamètres intérieurs aux entrées et aux sorties sont de $3,5 \cdot 10^{-2}$ m. Les parties supérieures et inférieures des entrées et sorties présentent une expansion ou une contraction graduelle (inclinaison $35,9^\circ$). La longueur entre l'entrée et la sortie de la vanne est de $18 \cdot 10^{-2}$ m de long. La vanne est insérée dans la boucle de nettoyage entre deux conduites droites de $50 \cdot 10^{-2}$ m de longueur.

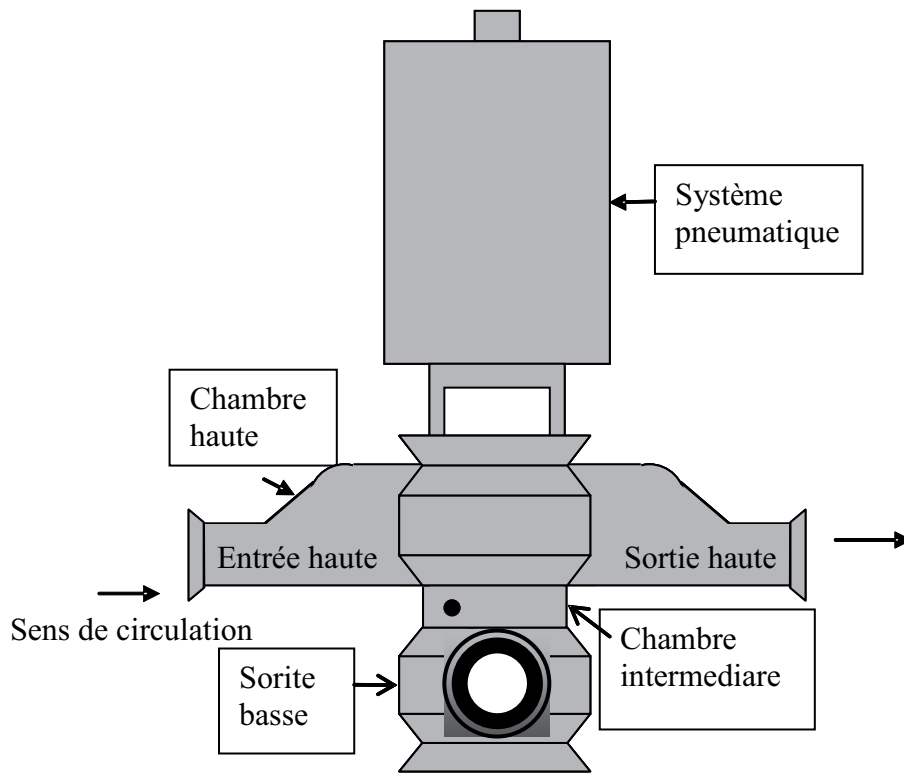


Figure IV.6 : Vanne bidirectionnelle 2 x2 voies

IV.2.4. Le racleur ou piston destiné à récolter les biofilms

Afin de pouvoir récupérer le biofilm à la surface interne des tubes cylindriques, un système de prélèvement que nous appelons « piston » a été mis au point. Des disques en caoutchouc dont le diamètre équivaut au diamètre intérieur des tubes ont été confectionnés. Le mode de fonctionnement de ce système de décrochement des bactéries est identique à celui des seringues. Au centre de chaque rondelle se trouve un trou permettant de monter l'axe poussoir. Le matériel utilisé pour la fabrication de ces pistons peut supporter des températures élevées et aussi des concentrations élevées de produit chimique. Ces deux caractéristiques nous permettent de nettoyer et de passer nos pistons à l'autoclave après chaque essai.

L'utilisation de ce racleur piston après sa confection a fait l'objet d'un test de validation d'efficacité. (Voir Annexe 3).

IV.2.5. Agitateur thermo-régulé.

Un bain thermostaté de marque HAAKE SWB 25 possédant une capacité de 20 litres, a été utilisé lors des cinétiques de nettoyage en conditions statiques. Cet outil contient un agitateur qui permet d'agiter doucement les tubes pendant la cinétique. Les tubes sont

immergés au cours de l'expérience et retirés en fonction des temps choisis pour suivre les cinétiques de nettoyage.

IV.2.6. La plate-forme expérimentale et le circuit NEP

La station NEP utilisée lors de cette étude reproduit une installation industrielle à l'échelle 1/10^{ième} (figures IV. 7 et 8).

Deux cuves thermostées de 200 L permettent de préparer et de stocker les solutions de nettoyage qui sont recyclées comme dans la plupart des installations industrielles. Le chauffage et le maintien en température sont assurés par un serpentin dans lequel circule de la vapeur sous pression. Une troisième cuve permet le stockage à température ambiante de 400 l d'eau osmosée (titre hydrotimétrique égal à zéro). Une pompe centrifuge (SOMEFLU, type HMI-N32/150) délivrant un débit maximum de 12 m³ h⁻¹ assure l'alimentation de la station NEP. Le débit de cette pompe est régulé par une vanne à membrane motorisée (GEMÜ[®], type 693) et est mesuré à l'aide d'un débitmètre électromagnétique (MAGFLO[®] MAG 1100, Danfoss, pleine échelle allant de 0,4 à 17 m³ h⁻¹).

Les séquences de nettoyage sont programmées sous Labview[®] (version 8.6). La plateforme pilote est équipée de capteurs de pression différentielle (Schlumberger, type 8D) permettant des mesures de 10³ Pa à 6x10³ Pa. La plate forme comprend également un capteur de pression relative 0-10⁴ Pa (Bourdon-Sedeme, type 24001 E703), ainsi que des sondes de températures à résistance de platine (PT 100). Les réponses des différents capteurs sont acquises en temps réel grâce à un convertisseur analogique-numérique (μ MAC 400, Analog Device) relié à un ordinateur de type PC par une liaison série RS232. Un logiciel d'acquisition permet la prise en compte des équations d'étalonnage des capteurs, le suivi graphique de l'évolution des grandeurs mesurées et de leur stockage sous une forme compatible avec les logiciels de traitement. Tous les capteurs sont reliés à cette centrale d'acquisition Agilent (Hewlett Packard[®]) et s'affichent sur un écran graphique pendant le déroulement de l'expérience.



Figure IV. 7 : Photographie de la plate forme expérimentale, les cuves sont situées sous la zone d'expérimentation. La zone test comprenant les tubulures en acier sont visibles.

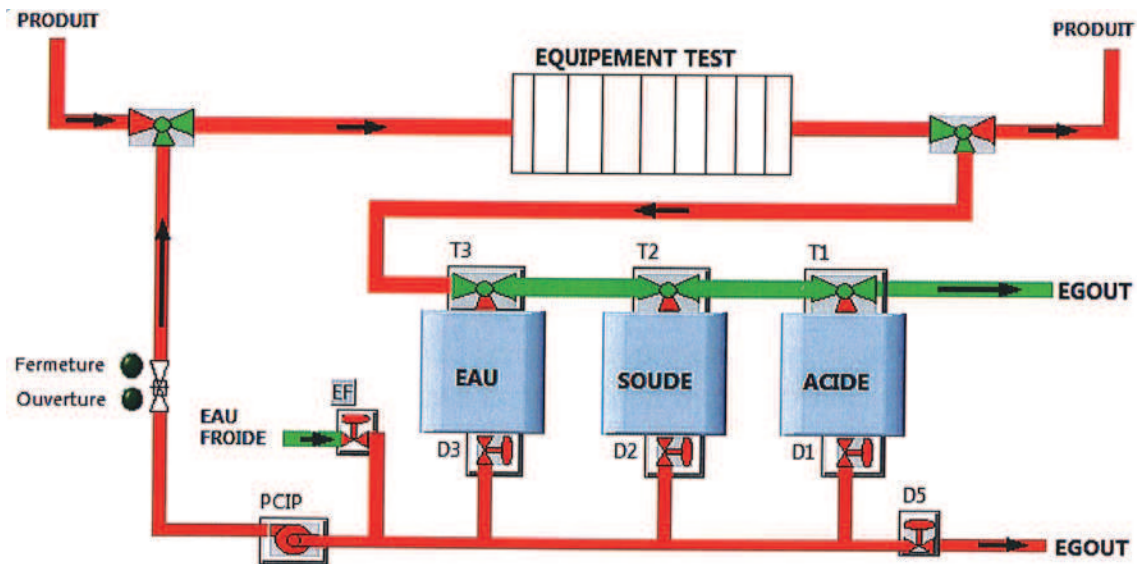


Figure IV. 8 : Représentation schématique de la plate forme expérimentale comprenant la station NEP.

Chapitre V : Méthode

Résumé

Ce chapitre est un descriptif de toutes les méthodes et manipulations effectuées au cours de cette thèse. Les différentes études réalisées au cours de cette étude comportent cinq étapes qui sont :

- i. phase d'encrassement des équipements testés ;
- ii. phase de nettoyage des équipements ;
- iii. phase de détection ou de dénombrement des la contamination résiduelle ;
- iv. phase de visualisation de la contamination résiduelle ;
- v. analyse statistique des résultats obtenus.

Les points 1 et 2 diffèrent pour les différentes manipulations. Ainsi pour plus de clarté, nous vous présenterons pour chaque type d'étude les deux premiers points et terminerons par les trois derniers points qui sont communs aux différents essais.

V.1. Cinétique d'élimination des biofilms de *Pseudomonas fluorescens*.

V.1.1. Phase de contamination des équipements

Contamination en condition semi-statique.

Au préalable, une suspension mère est préparée dans 50 ml de TSB après prélèvement de colonies à partir de boîtes de pétri contenant du milieu nutritif gélosé TSA (Trypton Soy Agar) et incubation une nuit à 30 °C. Cette culture est alors diluée dans du lait écrémé (1/10) de façon à obtenir une suspension bactérienne à 10^5 UFC ml⁻¹. Les biofilms sont formés dans les conduites cylindriques en acier inoxydable décrites précédemment après remplissage au laboratoire par la suspension de *P. fluorescens*. Les tubulures sont au préalable associées 3 par 3. Une première incubation de 24h à 20°C permet à la fois l'adhésion des cellules et la croissance de biofilm en surface. Placés sur le tourniquet et maintenus à 20°C, l'incubation dure dans cette première étape 24h. Après 24 h, les conduites sont vidangées et la suspension encrassante est remplacée par du lait non

contaminé (dilué au dixième également). Ils sont remis en rotation pendant 24 h supplémentaires. Cette étape est considérée comme un apport de nutriment. La contamination en condition semi-statique, si elle est représentative des cuves de stockage, des coudes, des zones à faible circulation en industrie agro-alimentaire, permet aussi et surtout d'avoir une contamination homogène des surfaces et ainsi de s'affranchir des conséquences que pourrait engendrer un écoulement lors d'un cycle de contamination.

Dans le but de pouvoir visualiser le biofilm avant et après le nettoyage des surfaces en acier inoxydable, des coupons ont aussi été utilisés. Le biofilm est formé dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus. Dans ce mode de formation, les coupons stériles sont placés dans des boîtes de Pétri pour être ensuite recouverts de la suspension encrassante. Les boîtes contenant les coupons encrassés sont mise à 20°C, pendant 24h sans agitation. Après ce temps de contact, un renouvellement du milieu encrassant est effectué par du lait stérile dilué au dixième. Les boîtes sont laissées 24 h supplémentaires pour permettre le développement du biofilm. A 48 h de formation, les coupons sont sortis de la suspension d'encrassement et rincé dans de l'eau ultra pure pour éliminer toutes traces de lait et aussi les bactéries mal adhérees. Nous n'avons pas choisi de mettre directement les coupons dans les tubes supports et de les positionner dans le tourniquet. En effet la géométrie particulière des tubes support des coupons aurait entraîné des artéfacts quand à la l'organisation du biofilm plus dommageable pour notre étude que le choix qui a été fait avec une croissance du biofilm en conditions complètement statiques.

Formation du biofilm mixte à *P. fluorescens* et à *B. cereus* 98/4.

Afin de s'affranchir d'un mélange lait-TSB (1/10), nous avons choisi de ne former le biofilm mixte que dans du TSB (1/10). Le mode de croissance du biofilm est identique à toutes les études réalisées auparavant. Au préalable, une suspension mère pour chaque souche bactériennes est préparée dans 50 ml de TSB après prélèvement de colonies à partir de boîtes de Pétri contenant du milieu nutritif gélosé TSA (Trypton Soy Agar) et incubation une nuit à 30 °C. Cette culture est alors diluée dans du TSB de façon à obtenir une densité optique de 0.01 pour *Pseudomonas* et de 0.02 pour *Bacillus* à 550 nm. Le mélange des deux souches se fait dans un tube conique stérile de 50 ml. Nous utilisons 2 volumes de *B. cereus* et 1 volume de *Pseudomonas*.

La formation du biofilm se fait en 48 h avec un renouvellement de milieu après deux heures d'adhésion dans du TSB (1/10). Après les 48 h de formation, les coupons sont rincés par immersion dans de l'eau ultra pure pour éliminer toutes traces de TSB mais aussi, les bactéries mal adhérentes. Comme décrit précédemment lors de l'étude réalisée avec les biofilms mono-espèces de *Bacillus*, trois coupons sont analysés dont deux pour la quantification de la contamination et un coupon pour l'imagerie à épifluorescence.

V.1.2. Phase de nettoyage/rinçage du biofilm de *Pseudomonas fluorescens*

Trempage

Cet essai a été réalisé avec les tubes droits cylindriques. La procédure de trempage commence par un pré-rinçage des tubes par immersion dans de l'eau adoucie à température ambiante pour éliminer les bactéries ne faisant pas partie du biofilm et le lait. Un tube est conservé pour identifier la contamination initiale. Les autres tubes sont ensuite remplis un à un par de l'eau osmosée préalablement chauffée à 40°C et fermés par des opercules puis le tout est plongé dans un bain-marie préchauffé à 40°C. Les tubes sont ensuite prélevés régulièrement pour visualiser un éventuel décrochement lié au trempage et rincé par un nouveau trempage rapide dans de l'eau osmosée à température ambiante. Les temps choisis sont ceux que nous utilisons pour l'ensemble des cinétiques à savoir, 1, 3, 5, 10, 15, 20 et 30 min.

Nettoyage en conditions statique en présence de soude.

Cette étude a nécessité l'utilisation de plusieurs concentrations de NaOH (0,1% ; 0,35% ; 0,45%, 0,5%, 0,60%) pour une température de 60°C. Dans cette procédure de nettoyage, toutes les étapes sont identiques à la procédure de trempage décrite précédemment. Chaque tube après trempage dans la soude pour un temps donné est rincé comme décrit précédemment par trempage rapide dans de l'eau osmosée à température ambiante.

Rinçage et nettoyage en conditions dynamiques.

Cette expérimentation se déroule sur la plate-forme pilote. L'exécution du programme du NEP est entièrement automatisé pour s'affranchir de toutes variations possibles en mode manuel.

Pour les cinétiques de rinçage, 4 contraintes de cisaillements pariétaux ont été testées (0,144 Pa, 1,56 Pa, 4,506 Pa et 20 Pa). (calcul des contraintes annexes 7)

Pour la cinétique de nettoyage type NEP classique, nous avons choisi une contrainte pariétale moyenne de 0,144 Pa et une concentration en soude de 0,5%.

Dans chacune des conditions balayées, 4 essais ont été réalisés.

Le programme de rinçage/nettoyage se déroule comme suit :

- i. Pré-rinçage de 3 min sans recirculation à température ambiante à l'eau adoucie à 300 l h⁻¹ (moyenne de vitesse de 0,20 ms⁻¹, nombre de Reynolds (Re) = 4740),
- ii. Rinçage/nettoyage pour les durées suivantes, 1, 3, 5, 10, 15, 20 et 30 min,
- iii. Rinçage final sans recirculation de 3 min. Les tubes témoin de contamination subissent d'abord un rinçage à l'eau adoucie à 300 l h⁻¹ (moyenne de vitesse de 0,20 ms⁻¹, nombre de Reynolds (Re) = 4740) à la température ambiante pendant 3 min sans aucune recirculation.

Comme précédemment, les tubes témoins de contamination simplement trempés dans de l'eau osmosée permettent d'identifier le niveau initial de contamination.

Après chaque temps de cinétique, les trois tubes testés ensemble sont démontés, bouchonnés avec du papier aluminium, puis mis à égoutter. Les tubes sont par la suite transportés au laboratoire afin de quantifier la contamination résiduelle.

En conditions dynamique avec les coupons (0,144 Pa en tubes carrés)

Cette étude est réalisée avec les tubulures support pour coupons (tubes à section rectangulaire). L'objectif est de pouvoir observer via la microscopie, l'évolution des biofilms à l'issue de chacun des temps de cinétique ce qu'il est délicat d'envisager dans les tubulures en acier inoxydable. La procédure se déroule comme précédemment sur la boucle d'essai pilote. Cinq coupons sont ainsi insérés par tubes. Comme nous l'avons signalé précédemment, seuls les 3 coupons du centre sont analysés : 2 servent à quantifier le biofilm résiduel et le troisième sert à l'observation sous microscope (MEB ou à épifluorescence).

V.2. Cinétique d'élimination des biofilms de *Bacillus cereus*.

V.2.1. Phase de contamination des biofilms à *B. cereus*

En condition statique

24 coupons en acier inoxydable stériles sont utilisés pour la réalisation de cette étude. Les coupons sont encrassés avec une suspension de TSB (1/10) préalablement préparés dans un tube conique de 50 ml à une concentration voisine de 10^5 ufc.ml⁻¹. 12 coupons sont placés dans chaque grande boîte de Pétri, puis recouverts avec 25 ml de la suspension de contamination pendant deux heures juste le temps qu'il faut pour qu'il y ait adhésion. Après les deux heures d'adhésion, la suspension encrassante est aspirée pour être remplacée par une nouvelle suspension non contaminée. Les boîtes de Pétri contenant les coupons sont ensuite mise à l'étuve pendant 46 heures à 30°C.

V.2.2. Phase de nettoyage du biofilm de *Bacillus cereus*.

Quatre conditions expérimentales ont fait l'objet de cette étude. Nous avons testé trois souches bactériennes et pour chacune des souches, 4 essais ont été réalisés pour chaque condition. Ces conditions sont le trempage dans de l'eau ou dans une solution de 0,5% en NaOH sans action mécanique, le rinçage avec une contrainte pariétale de 2 Pa, ou le nettoyage avec de la soude à 0,5% ou 1 % et toujours une contrainte pariétale de 2 Pa.

Tous les essais avec les biofilms de *Bacillus cereus* se sont déroulés dans des tubes carrés. Les temps et le mode opératoire concernant les séquences dans la boucle d'essai pilote sont identiques à ceux réalisé avec les biofilms de *Pseudomonas fluorescens*.

V.3 Etude de réadhésion bactérienne au cours du NEP

Pour mieux appréhender la redéposition bactérienne au sein des équipements, des cinétiques d'élimination ont préalablement été réalisées avec des spores de trois souches de *Bacillus cereus*. Le mode d'encrassement diffère selon le type d'expérience. Les différents modes d'encrassement seront précisés dans ce qui va suivre. Ainsi, il vous sera présenté dans un premier temps l'étude réalisée sur les cinétiques d'élimination des spores de *Bacillus cereus* et dans un second temps la réadhésion bactérienne pendant le processus de nettoyage.

V.3.1. Cinétique d'élimination des spores de *B. cereus*

Phase de contamination des spores de *B. cereus*

La réalisation de cette étude a nécessité l'utilisation de 20 tubes droits cylindriques. Ces conduites sont encrassés avec une suspension bactérienne de concentration 10^4 ufc.ml⁻¹ suspendu dans de l'eau osmosée pendant une heure. Les conduites une fois remplies, sont maintenues verticalement pendant une heure à température ambiante. Un retournement des tubes est effectué toutes les 15 minutes pour éviter le dépôt des spores et s'assurer de l'homogénéité de la contamination. Les géométries sont ensuite vidangées et transportées sur la plateforme de NEP en halle pilote.

Phase de nettoyage des équipements

Au bout d'1h contamination, les tubes sont vidangés et transportés sur la plateforme expérimentale. En vue de quantifier le nombre initial de spores au temps zéro, un pré-rinçage à 300 l.h⁻¹ (Re = 4740), à température ambiante d'une série de 4 tubes considérés comme étant les tubes témoins de contamination est effectué. Ces 4 tubes servent de point de départ de la cinétique. Cette action de pré-rinçage comme dans toutes les autres expériences décrites ci-dessus permet d'éliminer les spores mal adhérentes. L'expérience proprement dite, c'est-à-dire la cinétique d'élimination se déroule en trois étapes. :

- i. Un pré-rinçage à une contrainte pariétale moyenne de 0,14 Pa (Re = 4740) à température ambiante,
- ii. Un nettoyage en recirculation avec NaOH 0,5 % (p/p), 60°C et 4,56 Pa (Re = 59141) pour chacun des temps de cinétique ciblés,
- iii. Un rinçage final manuel en trempant directement les tubes dans une bassine contenant de l'eau adoucie changée à chaque temps de cinétique étudié.

Chaque temps de cinétique (5, 10, 15 et 30 min) correspond à une série de 4 tubes subissant les 3 étapes décrites ci-dessus. Après trempage chaque tube est bouchonné avec du papier aluminium pour éviter une contamination aéroportée et mise à égoutter pendant 20 min.

V.4. Etude de la redéposition de spores de *Bacillus cereus* sur un équipement complexe communément utilisé en industrie alimentaire.

V.4.1. Phase de contamination des équipements

Afin d'avoir un nombre élevé de bactéries détachées et aussi dans le même temps d'éventuels candidats pour une réadhesion, des niveaux de contamination conséquents étaient nécessaires. Ainsi, dans cette étude 2 séries de 4 tubes ont été encrassés par une suspension de spores de *B. cereus* à 10^7 ufc.ml⁻¹ dans l'eau pendant 1 h, tel que décrit ci-dessus. Cependant, 4 tubes ont été encrassés par une suspension à 10^3 ufc.ml⁻¹ afin d'évaluer le niveau initial de contamination avant le nettoyage. Ce taux plus faible permet d'effectuer un dénombrement direct de la contamination après moulage des surfaces par du milieu nutritif gélosé et incubation (voir description de cette méthode de détection au paragraphe V.5.1). A partir de ce dénombrement nous faisons l'hypothèse qu'une simple règle de 3 suffit à évaluer la contamination de surface des tubulures avec la suspension de spores à 10^7 cfu ml⁻¹ (voir description des résultats). Les deux séries de quatre tubes, après l'heure de contamination sont vidées et insérées dans le pilote avec des tubes stériles à certaines positions dans l'installation, tel que décrit dans la Figure V-1.

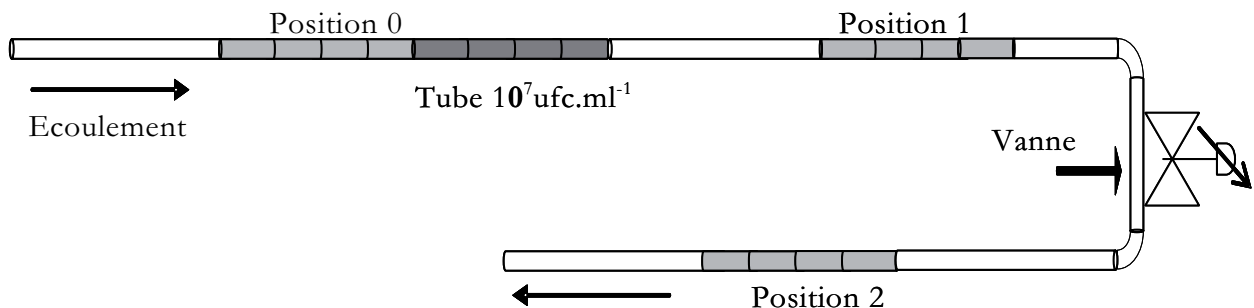


Figure V.1 : Schéma du circuit NEP utilisé pour l'étude de la réadhesion bactérienne.

V.4.2. Phase de nettoyage des équipements

Après une première étape de rinçage (300 l h^{-1} , 3 min, sans recirculation), les 4 tubes souillés à 10^3 ufc.ml⁻¹ sont retirés et remplacés par 4 tubes stériles (tube en position zéro). La plate-forme de test est ensuite soumise à une procédure de NEP avec NaOH 0,5 % (p/p) à 60°C et 4,5 Pa pendant 30 min avec recirculation.

Dans la même étude, des tubes stériles placés dans 3 positions différentes dans le circuit NEP et une vanne en acier inoxydable bidirectionnelle stérile ont été utilisés pour évaluer la

réadhésion dans l'équipement complexe. Après les 30 min de nettoyage, la vanne et les tubes sont retirés du circuit. La vanne quant à elle, est complètement démantelée, drainée et toutes les parties en contact avec l'air sont protégées avec le papier d'aluminium pour prévenir toute contamination.

V.5. Détection de la contamination résiduelle

V.5.1. Détection par moulage des tubes

La détection de la contamination résiduelle aux parois internes des tubes après nettoyage se fait par la méthode décrite par Husmark *et al.*, (1999). Cette méthode consiste à remplir à la moitié de leur volume des équipements (tubes cylindrique et vanne) par de la gélose nutritive. Cette gélose est constituée de 15 g.l⁻¹ d'agar bactériologique type E (poudre laboratoire Biokar) et de 13 g.l⁻¹ de bouillon nutritif 1,3% NaCl (poudre lyophilisée du laboratoire Bio-rad). Après préparation, la gélose est stérilisée à 121 °C pendant 30 min, puis conservée en chambre froide pour éviter toute contamination. Avant toute utilisation, la gélose est fondue et mise en surfusion à 58°C puis additionnée de 0,1% p/p de chlorure de tétrazolium (TTC 1%). Le TTC étant un sel soluble et incolore, est utilisé dans la chaîne respiratoire des bactéries. Il est réduit en un composé appelé formazan de couleur rouge qui précipite. Ce composé, en s'accumulant colore les colonies en rouge ce qui les rend facilement dénombrables.

Après le moulage, les tubes sont placés horizontalement et laissés à température ambiante pendant 4 heures. Ce temps permet la génération des cellules filles et la formation de microcolonies bactériennes.

S'agissant de la gélose contenue dans la partie pleine de la vanne, elle est découpée au cutter avant d'être extraite avec précaution. Quant aux constituants de la vanne (fond de vanne, tête du manomètre, piston bas et haut), ils sont mis en contact avec de la gélose dans des boîtes de Pétri.

Pour les tubes cylindriques en acier inoxydable, les moules de gélose sont extraits avec précaution après 4 h des conduites et délicatement déposés sur des plaques de PVC transparent (permettant par la suite d'éclairer les géloses par le dessous et photographier l'ensemble), puis mis à incuber durant 24h à 30°C.

Tous les moules et empreintes sont photographiés au moyen d'un appareil numérique Olympus camedia C-2020Z. Ces photos sont sauvegardées pour une exploitation ultérieure. Le comptage des colonies se fait manuellement. Cette méthode a été essentiellement appliquée lors des essais réalisés au cours des études de la réadhésion bactériennes (*Bacillus cereus*) et aussi lors de l'étude réalisée avec les biofilms de *Pseudomonas fluorescens*.

V.5.2. Détection par raclage de la surface interne des tubes

Les tubes cylindriques après nettoyage sont transportés au laboratoire pour être analysés. Pour chaque tube à tester, un erlenmeyer contenant 10 ml d'eau peptonée additionnée de tween 80 (20%) et 3 joints plastiques stériles sont préparés. La quantification de la contamination résiduelle adhérente à la paroi interne des tubes consiste au passage successif de trois joints dans le sens de l'écoulement. Les joints sont portés par une tige de 30 cm environ. Après chaque passage les joints sont placés dans une fiole qui subit l'étape du VSV (vortex 30s, sonication 2min30s et vortex 30s). La quantification se fait alors avec le surnageant bactérien du biofilm décroché des tubes. Elle se fait par dilutions successives sur boîte de Pétri. L'utilisation de cette méthode a fait l'objet d'une étude de validation présentée en Annexe 3. Cette méthode a été appliquée lors de la quantification des biofilms résiduels de *Pseudomonas fluorescens*.

V.5.3. Détection par écouvillonnage

La quantification par écouvillonnage a été appliquée à tous les essais réalisés avec les coupons en acier inoxydable. Comme dans les essais réalisés sur les tubes cylindriques où nous avons utilisé 3 pistons, 3 écouvillons ont aussi été utilisés pour décrocher les bactéries résiduelles après les cinétiques de nettoyage. Chaque coupon est écouvillonné trois fois avec différents écouvillons (1 grattage horizontal et 2 grattages verticaux). Les 3 écouvillons sont placés dans des tubes de dilutions contenant du TSB (1/10) additionné de Tween 80 (20%). Chaque tube contenant les tiges d'écouvillons subit l'étape du VSV. Après cette étape, le surnageant bactérien est dénombré sur boîte de Pétri.

V.5.4. Quantification du pourcentage de spores dans les biofilms

Les biofilms de *Bacillus cereus*, au cours de leur formation produisent des spores. Une quantification de la proportion de spores formées est effectuée. Pour cela, un bain-marie est chauffé à 75°C. Ainsi, chaque tube contenant le surnageant des différents temps de la cinétique est pasteurisé pendant 11 min. Les échantillons sont refroidis à température ambiante, vortexé pendant 30 s avant d'être étalés sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive pour ensuite dénombrer les colonies bactériennes de façon classiques.

V.6. Analyse d'images

Deux méthodes de visualisations microscopiques ont permis durant cette thèse d'observer la structure des cellules résiduelles.

V.6.1. Le MEB (microscopie électronique à balayage)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Avant toute analyse, l'échantillon est fixé par du tampon Cacodylate de sodium ($(CH_3)_2AsO_2Na \cdot 3H_2O$, *pm 214,05*: 2,14g dans 50 ml d'eau distillée, auquel on ajoute 2,7 ml de HCl 0,2N)). Les échantillons n'étant pas traités le même jour, cette fixation permet de les conserver.

La face supérieure du coupon contenant le biofilm est métallisée avant toute observation.

V.6.2. La microscopie en fluorescence

La microscopie en fluorescence (ou en épifluorescence) est une technique utilisant un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence et de phosphorescence, au lieu de, ou en plus de l'observation classique par réflexion (physique) ou absorption de la lumière visible naturelle ou artificielle. Avant l'observation au microscope, une coloration à l'acridine est effectuée. Ce colorant colore en orange l'ADN des cellules viables et en vert celle des spores.

La concanavaline A couplée au fluorochrome Alexafluor 488 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) a été utilisée pour marquer les exopolysaccharides sécrétés par les souches de *P. fluorescens* lors de la formation des biofilms. Cette lectine se fixe spécifiquement aux résidus saccharidiques D-glucose et D-mannose. La solution stock de concentration 5

mg/ml de Concanavaline A a été préparée en ajoutant 1 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 0,1M pH 8,3 et stockée à -20 °C. La solution de travail est préparée en diluant la solution stock au 1/25^{ème} dans de l'eau physiologique. 100 µl de cette solution de travail sont mises au contact des biofilms de *P. fluorescens* réalisés sur des lames d'acier inoxydable sur une surface de 1 cm². Les lames sont ensuite laissées à température ambiante pendant une heure à l'obscurité. Les biofilms sont ensuite rincés avec 25 ml d'eau ultrapure stérile et observées au microscope à épifluorescence (Zeiss, Le Pecq, France) (excitation 495nm ; émission 519nm)

Les observations effectuées avec ce microscope avaient pour but d'observer la structure bidimensionnelle du biofilm et de discerner dans les biofilms à *Bacillus* les spores formées des cellules végétatives.

V.7. Analyse statistique

V.7.1. Méthodes non paramétriques (le gentil *et al.* 2009 ; Bénézech *et al.*, 2001).

La dispersion des résultats de la contamination initiale ou résiduelle entre essais pour une même zone rend leur interprétation difficile. Un traitement statistique est donc nécessaire afin d'obtenir une interprétation correcte du phénomène. Une méthode statistique non paramétrique a été utilisée (Bénézech *et al.*, 2001). Elle permet de dresser une cartographie de la contamination initiale ou résiduelle observée sur la paroi des géométries testées. La méthode consiste à définir arbitrairement des zones pour chaque géométrie, plus le nombre de zones et important et la découpe est fine, meilleure sera la caractérisation de la géométrie au niveau contamination. Au contraire, une découpe en grandes zones, ne permet d'avoir qu'une idée globale pour chaque géométrie, ce qui peut biaiser l'interprétation de l'effet local de l'écoulement sur le décrochement bactérien. Le traitement statistique, effectué avec le logiciel S-plus (Seattle, USA), permet de regrouper les zones de contaminations comparables et d'obtenir plusieurs groupes avec un niveau de contamination spécifique à chaque groupe. (Voir Annexe 4 pour la méthode de formation des groupes de contamination)

V.7.2. Méthode paramétrique avec les analyses de variance AVEC SAS

Les essais sont répétés 4 fois pour chaque expérience.

Une analyse de variance permet de qualifier l'effet des différents paramètres testés ou variables explicative (souches, contrainte pariétale, concentration en soude, localisation de la tubulure ou du coupon, numéro de l'essai) sur la variable à expliquer qui est soit une quantité de bactéries résiduelles ou un paramètre cinétique. Cette analyse de variance se fait au moyen du logiciel SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). Nous testons l'hypothèse nulle de non effet des variables explicatives et dans le cas où le modèle est accepté, nous voulons discerner de la variabilité totale la variabilité due à telle ou telles variable explicative.

Par ailleurs, quand cela est possible nous effectuons un test de comparaison multiple de moyennes (test de Tukey) au seuil de probabilité de 5%. Nous pouvons ainsi dans le cas de variables explicatives non numériques (souches par exemple) regrouper les différents items et les classer en sous ensembles conduisant à des valeurs de la variable expliquée significativement différentes.

V.7.3. Modélisation des cinétiques

Les coefficients du modèle sont identifiés par régression non linéaire à partir des valeurs expérimentales au moyen du logiciel GinaFit.

GInaFiT (Geeraerd et Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) est un freeware (complément) pour Microsoft Excel visant à combler le fossé entre les personnes qui développent des approches de modélisation prédictive et les utilisateurs finaux dans l'industrie alimentaire ne connaissant pas, ou ne disposant pas non plus d'outils avancés d'analyses de régression linéaire. Plus précisément, cet outil est utile pour tester neuf différents types de modèles de survie des microorganismes spécifiques à l'utilisateur sur des données expérimentales concernant l'évolution de la population microbienne avec le temps. À ce titre, les auteurs ont couvert toutes les formes de courbes de survie connues des cellules bactériennes. Parmi ces 9 modèles, la cinétique d'inactivation diphasique a fait l'objet du modèle utilisé pour notre étude. Suite à la modélisation des résultats, les valeurs des paramètres sont obtenues et les mesures statistiques sont automatiquement calculées. GInaFiT peut aider à communiquer plus aisément sur les résultats de certains processus comme la conservation des aliments en termes de nombre de cycles de réduction logarithmique plutôt que la valeur de D-classique.

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

Chapitre VI : Etude des cinétiques d'élimination des biofilms de *Pseudomonas fluorescens*.

Résumé

Dans les industries alimentaires, les biofilms peuvent être une source de contamination des aliments. Cette présence de biofilm peut causer en amont une perte de production, et en aval causer des risques graves sur la santé du consommateur telle que des épidémies d'origine alimentaires causées par des pathogènes (Lapidot et al., 2007 ; Gandhi & Chikindas, 2007. Différentes contraintes de cisaillements ont été utilisées lors de cette étude. Pour chaque contrainte 4 essais ont été effectués. Ces répétitions nous permettent de prendre en compte dans nos analyses, la variabilité de l'expérience et de pouvoir discerner l'influence des paramètres (variables expérimentaux) sur la variable expliquée (bactéries résiduelles). Les cinétiques obtenues ont été modélisées à l'aide du modèle diphasique issu du logiciel GiNaFiT. Les analyses ont montré que le biofilm formé est constitué de deux sous-populations. Ainsi les travaux ont permis de montrer qu'au cours du nettoyage, une grande fraction de la population (première sous-population) bactérienne est éliminée dans les premières minutes. Les bactéries se trouvant dans la sous-couche profonde (deuxième sous-population) sont plus difficiles à éliminer.

VI.1. Choix du modèle cinétique

Nous avons présenté dans la partie bibliographique un certain nombre de modèles mathématiques décrivant l'évolution de populations microbiennes dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle. Nous avons voulu ici faire un parallèle entre ces propositions de modèles et les observations expérimentales d'élimination de biofilms bactériens au cours du temps lors d'opération de nettoyage de systèmes fermés (NEP). L'intérêt est d'identifier un nombre de paramètres (le plus petit) possible que nous nous proposons de relier à des caractéristiques physico-chimiques des biofilms et aux conditions opératoires que sont la concentration en détergent et les conditions hydrodynamiques. Trouver un modèle cinétique qui prenne en compte tous les paramètres pertinents régissant le processus de nettoyage peut s'avérer difficile. Cependant nous avons vu que pour les souillures alimentaires aussi bien Jennings *et al.*, (1957) que plus récemment Grant *et al.*, (1996), des modèles cinétiques d'ordre 1 s'avèrent largement suffisants. Gallot-Lavallée *et al.*, (1988) décompose le phénomène en 2 étapes cinétiques d'ordre simple, à savoir d'abord une

cinétique d'ordre zéro pour l'action chimique suivi d'une cinétique d'ordre 1 pour l'action mécanique. Dickinson *et al.*, (1997, 1998) travaillant dans le domaine médical, ont également utilisé des équations d'ordre 1 comme Jennings *et al.* (1957) pour modéliser la cinétique d'élimination des cellules de *Staphylococcus aureus* à partir des surfaces en polyuréthane dans une chambre à flux radial. Plus récemment en 2002, Durr quant à lui, s'est basé sur les modèles du type distribution de Weibull, modèle à deux paramètres pour décrire l'ensemble des cinétiques de nettoyage de souillures laitières dans les échangeurs de chaleur qui comme l'avait démontré Gallot-Lavallée *et al.* (1988) ne sont pas purement log-linéaires. Si cette approche peut apparaître comme relevant d'un simple ajustement de modèle à partir des données expérimentales, Durr (2002) interprète les cinétiques de nettoyage en pertinence avec le modèle de Weibull comme étant une distribution des durées de vie des éléments de souillures au cours du temps. La fraction de souillures restant sur les surfaces s'exprime suivant la loi suivante (équation VI-1).

$$r(t) = e^{-\left(\frac{t}{T}\right)^R} \quad \text{équation VI-1}$$

T est une constante de temps correspondant au temps nécessaire pour réduire la quantité de souillures de 63,2% et R est la pente de la courbe entre le logarithme de $\log(1/r)$ et $\log(t)$. Pour $R < 1$, cela signifie que la durée de vie des éléments de souillures restant augmente au cours du temps. Autrement dit, cela se traduit par une difficulté à éliminer la souillure résiduelle progressivement plus élevée au cours du temps.

Dans une étude réalisée par Lelièvre *et al.* (2002), un modèle établi sur un équilibre entre le dépôt et l'élimination des spores de bactéries pendant le nettoyage a été proposé. Les deux cinétiques, dépôt et arrachement suivent des cinétiques d'ordre 1. L'élimination des spores conduit en effet à un phénomène de dépôt qui expliquerait que les surfaces ne sont jamais propres en fin de nettoyage. Cette observation dans le cas de contamination par des formes sporulées, a été confirmée récemment par Le Gentil *et al.* (2010) et Faille *et al.* (2010) et fait l'objet d'un chapitre de la thèse.

Herrera *et al.* (2007) ont mis au point une équation logistique à trois paramètres principaux. Ces paramètres sont : l'asymptote, le taux de détachement et le coefficient de forme qui permet d'ajuster les courbes expérimentales et décrire la cinétique de détachement de bactéries. Leur étude est en rupture avec celles d'auteurs tels qu'Eginton *et al.* (1998) et Midelet *et al.* (2006) qui ont, eux, proposé une cinétique de premier ordre pour décrire les cinétiques d'élimination de la contamination microbienne. Aussi, Herrera *et al.*

(2007) ont déclaré que les cinétiques ne doivent pas simplement être vues comme une simple élimination exponentielle, mais que la non linéarité entre les $\log N$ (N population bactérienne détachée ou population résiduelle) avec le temps devrait être mieux pris en compte.

Geeraerd *et al.* (2005) ont proposé un logiciel de neuf différents modèles de survie microbienne. La spécificité de ce logiciel est qu'il permet à l'utilisateur de partir des données expérimentales et après modélisation, d'obtenir des paramètres pouvant lui permettre de les interpréter aisément avec les critères d'ajustements correspondants. L'évolution de la population microbienne en fonction du temps avec cet outil se définit à travers trois principaux modèles de log-linéaire, Weibull et diphasique. Ces modèles ont été principalement conçus et appliqués pour les courbes de destruction des microorganismes.

C'est le modèle diphasique qui nous semble le plus pertinent (équation VI-2) dans le cadre de notre étude. C'est un modèle à 3 paramètres, k_{max1} (s^{-1}) la constante de vitesse d'élimination de la population bactérienne majoritaire, k_{max2} (s^{-1}), la constante de vitesse d'élimination de la sous population bactérienne minoritaire et f le coefficient de partage entre ces deux fractions de la population bactérienne présente sur les surfaces étudiées et représente la fraction de population majoritaire.

$$N(t) = (N_0) \left(f \cdot e^{-k_{max1}t} + (1-f) \cdot e^{-k_{max2}t} \right) \quad \text{Equation VI - 2}$$

VI.2. Etude cinétique en dynamique

L'objectif de cette étude étant l'hygiène des surfaces dans les environnements agro-alimentaires, nous nous sommes focalisés ici sur l'action des contraintes de cisaillement produites au cours du nettoyage, représentatives des contraintes rencontrées dans le secteur industriel. Pour chaque essai, quatre répétitions ont été effectuées afin de mieux prendre en compte la variabilité inter essais et ainsi identifier les mécanismes physiques mise en jeu lors de l'arrachement. Nous avons testé quatre contraintes de cisaillement citées précédemment (0.144, 1.556, 4.502 et 20 Pa) en plus du trempage qui représente le témoin de notre étude.

VI.2.1. Taux de réduction décimale de la population initiale

La figure ci-dessous représente les valeurs moyennes des réductions décimales des différents essais réalisés en fonction du temps pour les différentes contraintes de cisaillement étudiées.

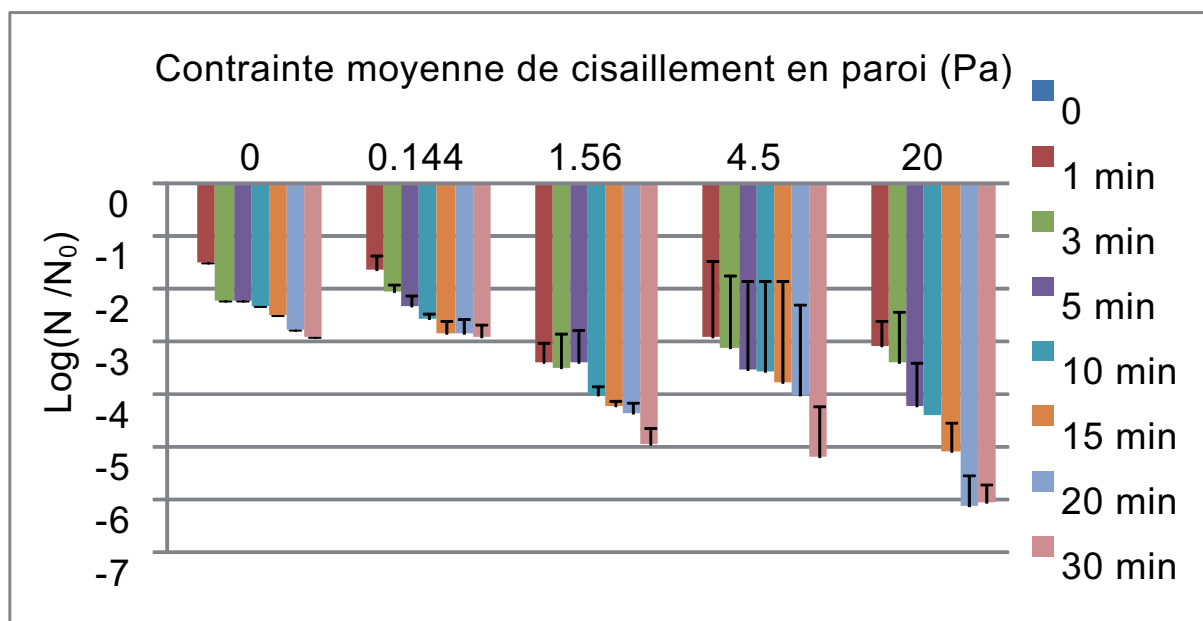


Figure VI-1: Evolution du taux de réduction décimale de la population viable et cultivable en fonction de la contrainte de cisaillement.

Les essais ci-dessus illustrés dans la figure ont été réalisés à concentration bactérienne initiale d'environ 10^7 ufc cm^{-2} (concentration de la population bactérienne au sein du biofilm). Que ce soit à contrainte nulle ou faible (0,144 Pa), il est observé une réduction décimale d'environ 2,8 unités log (ou 2,8 log pour faciliter l'écriture) en 30 minutes. En une minute, il est éliminé environ 1,5 log des tubulures. Une part non négligeable de la contamination apparaît comme très faiblement adhérente car un simple trempage dans l'eau suffit pour la décrocher.

Les contraintes de cisaillement de 1,56 et 4,5 Pa conduisent en 30 minutes à une réduction décimale de 5 à 5,5 log, avec en 1 minute une réduction de plus de 3 log. Par ailleurs, si l'on multiplie par 5 cette contrainte moyenne, le taux de réduction décimale en 30 minutes atteint près de 6,5 log après une réduction de 3 log en 1 minute comparable aux observations pour les contraintes de 1,56 et 4,5 Pa. La partie facilement détachée du biofilm semble se situer autour de 3 puissances de 10 même quand la contrainte est multipliée par un facteur 5. En revanche, il semble y avoir un impact clair sur l'importance de la population résiduelle après 30 min de rinçage, puisque la réduction décimale maximale observée atteint près de 7 log.

Dans une étude réalisée par Dunsmore *et al.* (1981), une réduction semblable avait été obtenue (près de 3 log, soit 99,8% précisément) lors de la phase de nettoyage d'un encrassement bactérien présent sur une surface en acier inoxydable. Ils ont ainsi conclu a

l'issue de leur étude que la phase de nettoyage est essentielle, car elle permet ultérieurement une désinfection réduisant le risque de contamination des aliments très faible.

Gibson *et al.* (1999), sur surfaces ouvertes avec des biofilms jeunes de *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* puis séchées n'observent aucune amélioration significative de leur élimination avec l'augmentation de pression de l'eau pulvérisée sur les surfaces. Mais plus récemment dans des conditions comparables, Burfoot & Middelton. (2009) montrent un impact significatif de l'augmentation du temps d'application du jet sur la surface. Nos biofilms ne sont pas séchés et comme nous l'avons dit précédemment, une part non négligeable est éliminée par simple trempage. En revanche l'augmentation du temps d'application de la contrainte a un impact réel sur l'arrachement car entre 5 et 30 minutes la population bactérienne diminue de plus de 2 log pour les trois contraintes les plus fortes testées.

VI.3. Modélisation des cinétiques d'élimination

L'observation des graphes figure VI-2, nous montre deux phases de décrochement. Une première phase de réduction se déroule dans les trois premières minutes environ et une seconde phase conduisant à une population résiduelle variant de quelques cellules par cm^2 à plus de 10^4 ufc.cm^{-2} . Comme le montre Herrera *et al.* (2007) le phénomène de décrochement n'est pas ici non plus log linéaire. La première phase correspond à l'élimination d'une partie du biofilm *a priori* très fragile ou fragilisé par le trempage dans de l'eau, même si le biofilm a été au préalable développé dans un milieu très hydraté (lait dilué au 1/10). On peut avancer l'hypothèse d'une hydratation très rapide du biofilm dès qu'il est en contact avec de l'eau pure lié au comportement de la matrice constituée d'exo-polymères.

La deuxième phase d'élimination observée durant les 27 min suivantes semble clairement influencée par la contrainte pariétale. Cette phase de réduction dépend de la force de cisaillement induisant un transfert de masse du biofilm au fluide circulant. Dans cette phase, on remarque une augmentation relativement faible de la réduction de la contamination résiduelle entre 4.5 Pa et 20 Pa comparativement à l'effet produit par une augmentation de contrainte de 0.1 à 4.5 Pa. Une observation de même nature a été faite par Gibson *et al.* (1999) puis Burfoot & Middelton. (2009). Le bénéfice de l'augmentation de contrainte semble de plus en plus réduit lorsque l'on s'adresse à des gammes de contraintes élevées.

Cela nous permet d'avancer l'hypothèse d'une fraction de la population initiale fortement adhérente qui ne pourra pas être éliminée par simple rinçage.

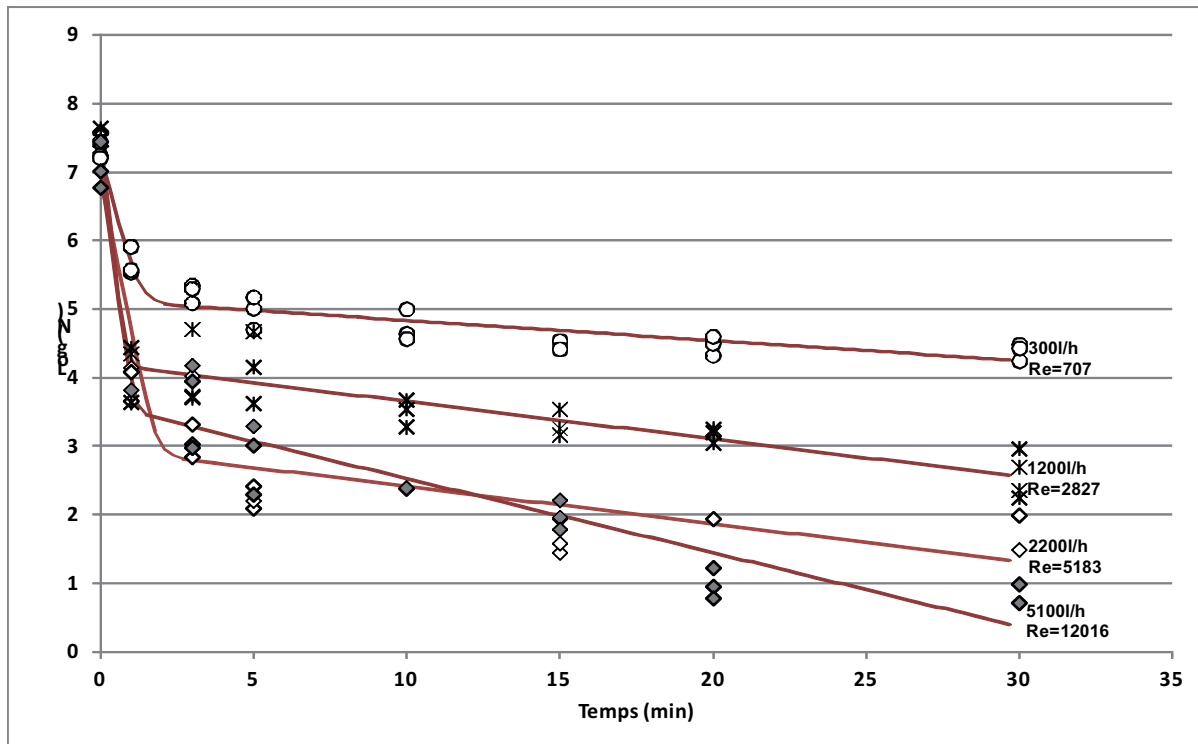


Figure VI.2 : Cinétique d'élimination des biofilms de *P. fluorescens* lors des différentes conditions de nettoyage testées.

VI.4. Analyse des paramètres du modèle

Le tableau ci-dessous récapitule les valeurs moyennes des paramètres du modèle mathématique utilisé lors de notre étude.

Tableau VI. 1: Moyenne des paramètres du modèle cinétique utilisé.

Contrainte(Pa)		0	0.144	1.565	4.56	20
	f	0,990	0,991	0,999	0,998	0,999
Paramères	$K_{max1} (s^{-1})$	3,83	3,83	6,98	9,90	14,19
	$K_{max2} (s^{-1})$	0,06	0,07	0,11	0,15	0,30

L'observation de ce tableau confirme bien les observations émises ci-dessus. Par exemple à 0.144 Pa, $K_{\max 1}$ (s^{-1}) = 3,83 soit environ 4 fois inférieur au $K_{\max 1}$ (s^{-1}) à 20 Pa (14,2 s^{-1}). Les mêmes observations sont faites aux contraintes 1.565 Pa et 4.56 Pa qui donnent respectivement pour $K_{\max 1}$ les valeurs de 6,98 et 9,90 s^{-1} soit environ deux à trois fois supérieurs au $K_{\max 1}$ à 0,144 Pa. Quant à $K_{\max 2}$, il est 4,5 fois supérieur à 20 Pa qu'à 0,144 Pa. Toutes ces observations nous montrent qu'au fur et à mesure que la contrainte pariétale augmente, les paramètres $K_{\max 1}$ et $K_{\max 2}$ augmentent soit de façon linéaire pour $K_{\max 2}$ soit suivant grossièrement un ordre 2 pour $K_{\max 1}$ (Figure VI.3).

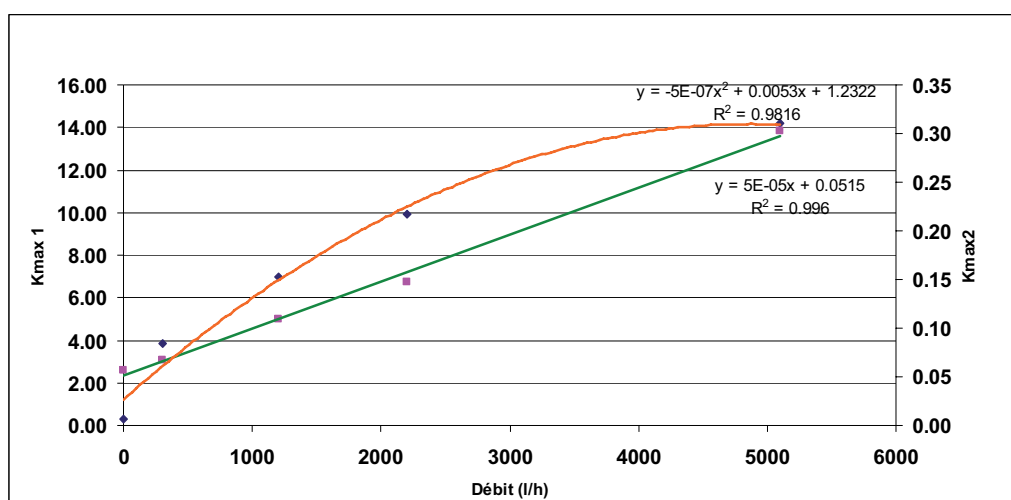


Figure VI. 3 : Paramètres $K_{\max 1}$ (s^{-1}) et $K_{\max 2}$ (s^{-1}) en fonction du débit utilisé. (vert $K_{\max 1}$ (s^{-1}) et en rouge $K_{\max 2}$ (s^{-1})).

Cependant nous pouvons également constater une grande différence entre les deux constantes de vitesse identifiées, $K_{\max 2}$ est en général bien plus faible et on observe un facteur 50 entre les deux paramètres à 20 Pa. Ici nous raisonnons sur les valeurs moyennes mais cette tendance est confirmée par l'analyse statistique qui prend en compte l'ensemble des données observées. Les deux paramètres, $K_{\max 1}$ et $K_{\max 2}$ dépendent de façon significative des contraintes de cisaillements avec des probabilités respectives de 0,0033 ($K_{\max 1}$) et 0,025 ($K_{\max 2}$). Ceci confirme l'importance de la force de cisaillement en paroi dans l'hygiène des équipements comme cela a été largement observé (Travaux de Blel *et al.*, 2009 et 2010 pour ne citer que les plus récents) mais comme nous l'avons vu précédemment, ces travaux ont été menés sur des cellules adhérentes et non des biofilms *sensu stricto*. C'est déjà différent avec des biofilms comme l'on montré les équipes de Campden BRI (Gibson *et al.*, 1999 et Burfoot & Middleton, 2009).

VI.5. Analyse d'image

L'observation du biofilm de *Pseudomonas fluorescens* dans les tubes cylindriques n'étant pas facilement réalisable techniquement, nous avons choisi de travailler avec des coupons en acier inoxydable (cf chapitre V) placés dans des portoirs ayant la forme de tubes à section rectangulaire. Ainsi, 24 coupons de la même finition que les tubes cylindriques ont été utilisés pour réaliser ces observations. Après encrassement des coupons, les biofilms formés ont été rincés avec une contrainte pariétale moyenne de 0,144 Pa. Les coupons sont ensuite séchés à la flamme. Ceux utilisés pour le MEB sont trempés directement dans une solution de Cacodylate afin de fixer les cellules, et les autres pour des observations sous microscope à épifluorescence sont recouverts d'acridine orange pendant 15 min à l'obscurité. Après les 15 min, les surfaces sont rincées, puis mises à égoutter. Quant aux coupons réservés pour le MEB, une métallisation des surfaces s'est avérée nécessaire.

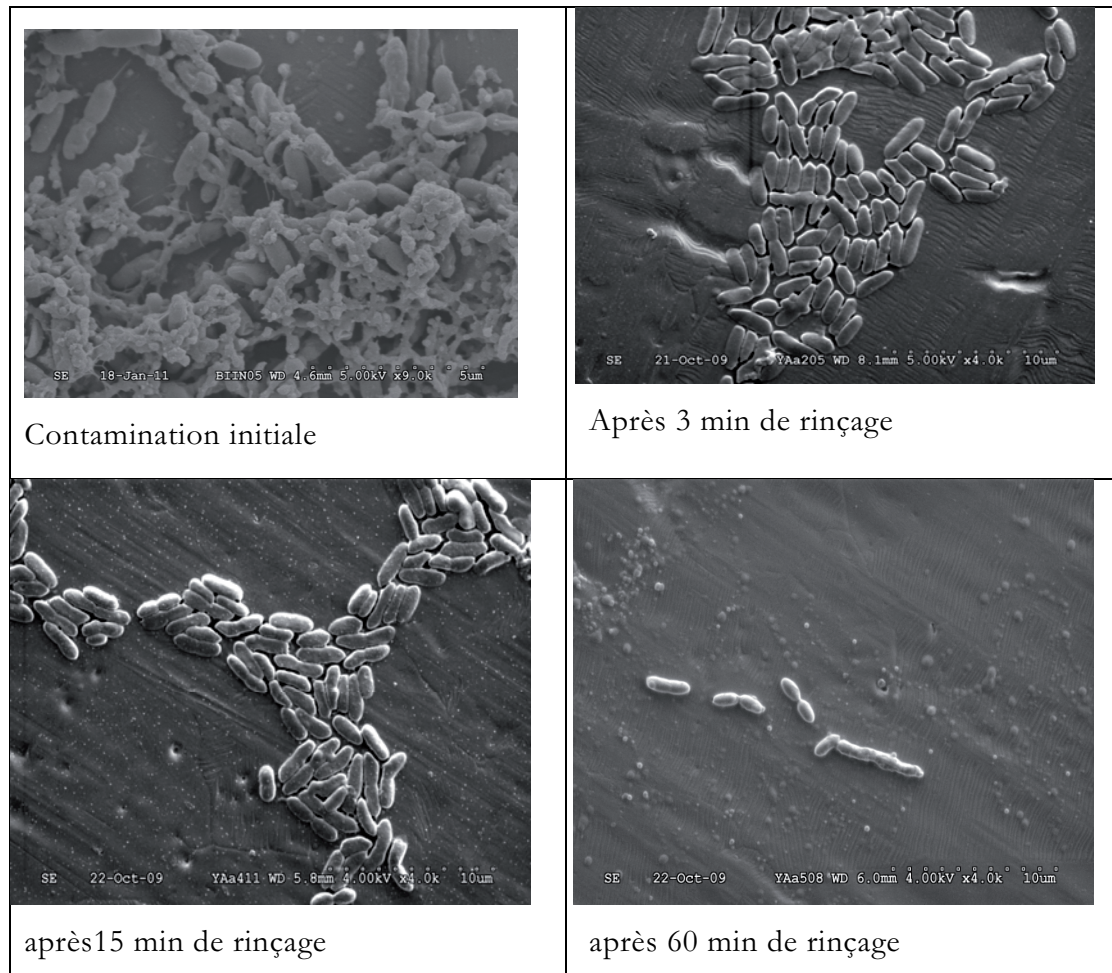


Figure VI. 4 : Observations au MEB des surfaces de coupons en acier inoxydable après rinçage pour les différents temps indiqués à la contrainte pariétale de 0,144 Pa.

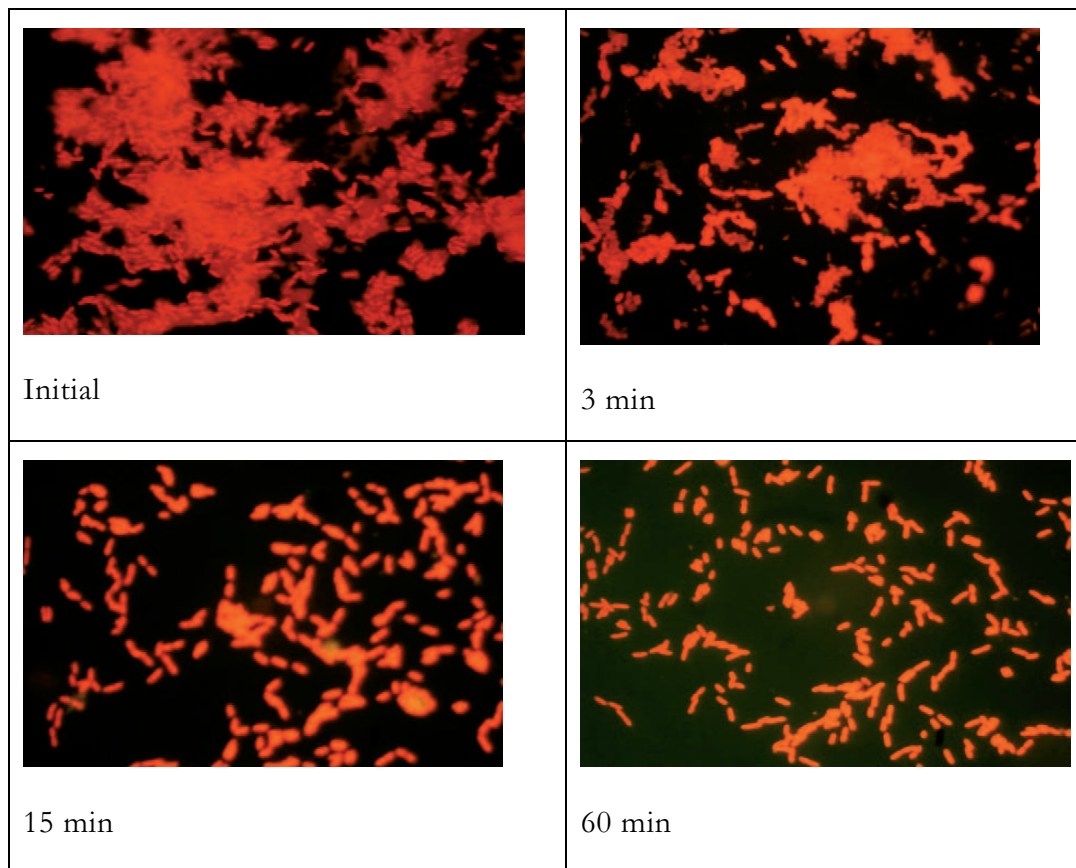


Figure VI. 5 : Observations en microscopie à épifluorescence (X100) des surfaces de coupons en acier inoxydable après rinçage pour les différents temps indiqués à la contrainte pariétale de 0,144 Pa.

Sur la figure VI-4, le biofilm initial montre les cellules de *Pseudomonas* intégrées dans une matrice d'exopolymères. Après 3 minutes de nettoyage, la couche superficielle du biofilm a été arrachée, il ne reste à priori que les cellules directement adhérentes à la surface de l'acier. Sur la figure VI-5, il apparaît clairement une structure en 3 dimensions du biofilm qui est cependant encore visible à cette échelle après 3 minutes de rinçage. Mais comme observé en MEB, il y a effectivement des cellules plus ou moins isolées et directement en contact avec la surface d'acier. La désorganisation du biofilm et la disparition de la structure en 3 dimensions (disparition des amas) est parfaitement visible à 15 et 60 minutes. La quantité de bactéries résiduelles reste néanmoins relativement élevée (10^2 ufc.ml⁻¹).

La structure tridimensionnelle du biofilm est une structure fragile et les EPS ne génèrent pas ici de forces de cohésion suffisantes. En revanche les cellules du biofilm directement en contact avec la paroi apparaissent plus résistantes à l'arrachement comme nous l'avons vu précédemment au travers des cinétiques d'arrachement et un nombre relativement important de bactéries résiduelles est encore observé après 30 minutes de rinçage à 20 Pa. Les cellules directement en contact avec la surface peuvent en effet bénéficier d'un effet de

protection lié à la topographie de l'acier comme cela a été largement démontré par des auteurs comme Faille *et al.* (1999) et plus récemment pour des topographies bien particulières par Verran *et al.* (2009). Ici, l'acier utilisé est relativement lisse sans défauts de surface importants comme le laissent deviner les photographies en MEB. Cependant des creux à peine supérieurs à la taille des cellules de *Pseudomonas* sont visibles sur le coupon testé à 3 minutes de rinçage. Il a été démontré dans la littérature que la taille des défauts est importante en terme de rétention dès lors qu'elle devient proche de celle des microorganismes concernés (Tebbs *et al.*, 1994; Flint *et al.*, 2000; Edwards & Rutenberg 2001; Whitehead *et al.*, 2005; Whitehead & Verran. 2006). Par ailleurs les particularités des parois des cellules comme la présence de pilis favorisent l'adhésion des cellules et participent à la force d'adhésion. Des études récentes (Careli *et al.*, 2008 et Diaz *et al.*, 2011) pour des souches de *Pseudomonas fluorescens* soulignent l'importance de la prise en compte de la présence des structures de surface qui jouent un rôle a priori non négligeable dans la résistance à l'arrachement. Par ailleurs, les cellules ne sont probablement pas en contact direct avec les surfaces et probablement la présence d'EPS rentre dans ce jeu.

VI.6. Etude de l'effet chimique

Résumé

*L'hygiène des surfaces affecte la qualité et la sécurité des produits alimentaires. Cependant, si l'équipement et l'environnement de transformation sont conçus de manière hygiénique, un programme de nettoyage et une désinfection efficace sont la principale méthode de contrôle de la contamination des surfaces. Si les procédures d'hygiène ne sont pas efficaces, les micro-organismes et les résidus de produits alimentaires resteront à des concentrations qui peuvent affecter la qualité et la sécurité du produit transformé par ces mêmes lignes de production. Nous pouvons rappeler ici les principales étapes de ces procédures d'hygiène: le mouillage des dépôts par le produit chimique de nettoyage, la réaction de la substance chimique pour faciliter l'élimination des souillures de la surface, une action mécanique destinée à arracher les souillures et la prévention de la redéposition suivi éventuellement par une désinfection des surfaces propres (le Gentil *et al.*, 2010 ; Jennings, 1965; Koopal 1985; Holab 1992).*

Cette étude, essentiellement basée sur l'effet de l'énergie chimique nous à permis dans un premier temps de confirmer les conclusions faite par Bird & Barlett (1995) et dans un second temps de montrer que lors du contact du produit avec les désinfectant, la dissolution de celui-ci engendre sa déstructuration l'arrachement des amas.

L'objectif principal de cette étude est de prendre en compte l'effet de l'action chimique dans les mécanismes d'élimination des biofilms et d'identifier dans un premier temps le rôle du détergent seul puis de la combinaison actions mécaniques et chimiques sur un exemple de conditions opératoires. Nous ne prétendons pas ici apporter des réponses exhaustives. Pour rappel, le nettoyage industriel des surfaces fermées est un processus qui fait intervenir plusieurs facteurs que sont l'énergie mécanique (hydrodynamique) employée pour enlever physiquement les souillures, l'énergie chimique (détergent) qui va découper les souillures, les dissoudre, les hydrater, réduire les forces d'interaction surface/souillure pour les rendre plus faciles à enlever, l'énergie thermique (température) quant à elle agit sur les réactions chimiques, sur la facilité à hydrater les souillures organiques et le temps de nettoyage, c'est-à-dire, le temps de contact entre les souillures et le liquide aux concentrations ou aux températures variables.

La soude (NaOH) est le principal composant utilisé dans les détergents alcalins destinés au NEP. C'est une base forte reconnue comme excellente pour l'élimination des souillures protéiques (dénaturation, hydratation...) et grasses (saponification) (Watkinson, 2008). C'est la principale molécule utilisée en industrie laitière pour l'élimination des dépôts formés sur les surfaces des échangeurs de chaleur et a fait l'objet de nombreux travaux appliqués à ces industries (Lalande *et al.*, 1884, Bird & Barlett, 1995 ; Fryer *et al.*, 1993). Par ailleurs, en raison de son faible coût et de son efficacité, cette base est également utilisée dans les autres secteurs agro-industriels.

Dans cette étude, cinq concentrations de soude ont été testés : 0,1 ; 0,25 ; 0,45 ; 0,5 et 0,6% et nous rappelons que le nettoyage s'effectue en conditions statiques par trempage des tubes. Pour chaque concentration de soude, quatre essais ont été effectués.

Afin de déterminer l'effet de ce détergent sur le décrochement du biofilm, la même approche cinétique a été mise en œuvre avec un temps maximum de trente minutes qui correspond à une valeur maximale pour les industriels ; 15 à 20 min sont plutôt des temps d'application du détergent alcalin classique. Les résultats après modélisation sont présentés dans le graphique ci-dessous (Figure VI.6).

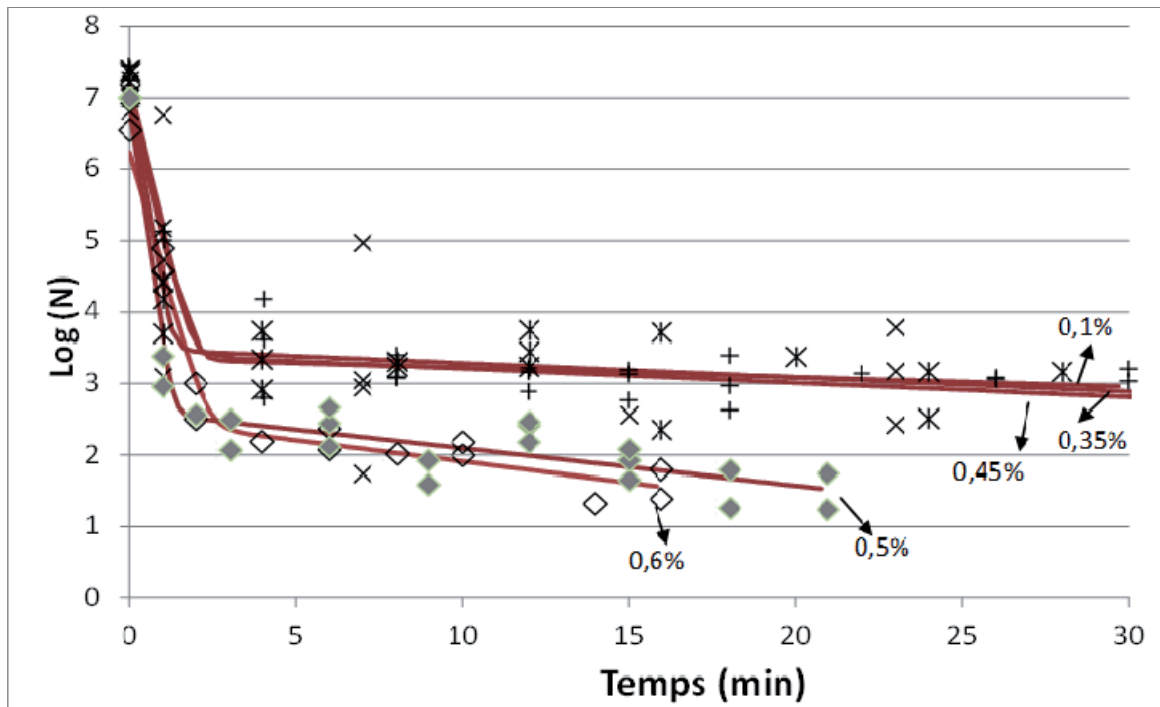


Figure VI. 6 : Cinétique d'élimination de l'effet chimique en statique (0,1 ; 0,25 ; 0,45 ; 0,5 et 0,6%) sur des biofilms de *Pseudomonas fluorescens*

L'observation des courbes nous montre deux groupes de concentrations. Le premier groupe constitué des concentrations 0,1 ; 0,35 et 0,45 % et le second groupe composé de 0,5 et 0,6%. Bien que l'on observe une plus grande variabilité entre les essais que précédemment le phénomène d'élimination du biofilm se déroule comme pour l'action mécanique en deux phases. L'ensemble des paramètres d'ajustement du modèle sont présentés en annexe 6 avec les valeurs des critères d'ajustement.

Ainsi pour les trois concentrations les plus faibles on observe environ 3 à 4 log de réduction après trois premières minutes de contact avec la soude avec un K_{max1} d'environ $3,5 \text{ s}^{-1}$ (tableau 1). L'identification de ce paramètre reste délicate compte tenu de la variabilité observée en particulier au temps 1 min. L'analyse statistique ne permet pas de distinguer l'effet de ces trois concentrations 0,1, 0,35 et 0,45% sur la constante de vitesse d'élimination de cette sous-population sensible aux effets de la soude. Nous ne pouvons pas non plus statuer sur une éventuelle amélioration de l'élimination du biofilm par comparaison avec un simple trempage dans l'eau ou avec une action mécanique douce (0,144 Pa).

En revanche la réduction de la contamination résiduelle pour la deuxième phase (sous population plus résistante) est d'environ 1 log en moyenne pour les concentrations de 0.5 et

0,6 % alors qu'elle n'atteint pas 0,5 log pour les trois concentrations les plus faibles. On a vérifié que l'effet perçu (1 log de réduction) n'était pas lié à la mortalité. Pour ce faire, les biofilms récupérés par grattage (piston) étaient observés sous microscope à épifluorescence avec une coloration live-dead après étalement sur lame. Cependant, nous avons pu constater que ces deux valeurs de 0,5 et 0,6% en soude correspondent à l'optimum de concentration identifié par Bird & Barlett (1995) pour l'élimination de souillures protéiques.

Tableau VI.2. : Valeurs moyennes des paramètres du modèle cinétique identifié.

Contrainte(Pa)		0.1%	0.25%	0.45%	0.5%	0.6%
	f	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999
Paramètres	$K_{\max 1} (s^{-1})$	3,36	4,57	2,10	8,83	4,32
	$K_{\max 2} (s^{-1})$	0,01	0,02	0,01	0,13	0,23

Il est bien établi que les bactéries au sein d'un biofilm sont plus résistantes que les bactéries en suspension dans un milieu ou même simplement adhérentes. Cette résistance est attribuée aux propriétés spécifiques du biofilm et en particulier la présence d'EPS (Hoyle *et al.*, 1992). La résistance de biofilms comme *Pseudomonas fluorescens* est classiquement étudiée sur des biofilms plus âgés ; 7 jours par exemple pour Simoes *et al.* (2008, 2009). Il est remarquable d'observer que même dans le cas de biofilms « jeunes », il reste une quantité de bactéries viables et cultivables non négligeable (10^2 ufc.cm⁻²) sur les surfaces après 20 minutes de trempage dans de la soude à 0,6% même si en moyenne comme le montre la figure VI-7, la valeur de $K_{\max 2}$ augmente de façon significative.

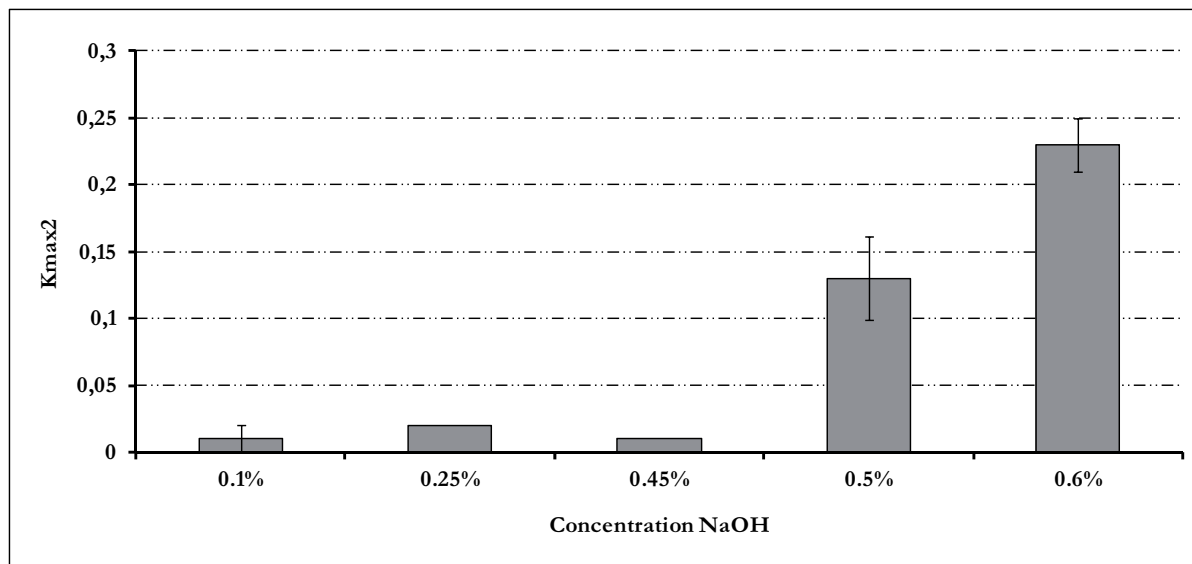


Figure VI. 7 : Influence de la concentration de soude sur le paramètre K_{max2} (s⁻¹).

Nous avons vu sur coupons que les biofilms étudiés forment des structures en 3 dimensions où la présence d'EPS est visible. La soude a donc pour effet de dissoudre ces amas comme le montrent les images de biofilms récupérés par grattage (piston) des surfaces des tubes et colorés par la coloration Live-Dead. On peut observer sur les images jusqu'à 0,45% de soude la présence d'amas cellulaire. Au-delà, des cellules de plus en plus isolées sont observées, c'est le cas à 0,5 et à 0,6%. A 0,6% et 5 min de trempage dans de la soude, ne sont observées pratiquement que des cellules isolées. Il n'en reste pas moins que les cellules sont encore vivantes.

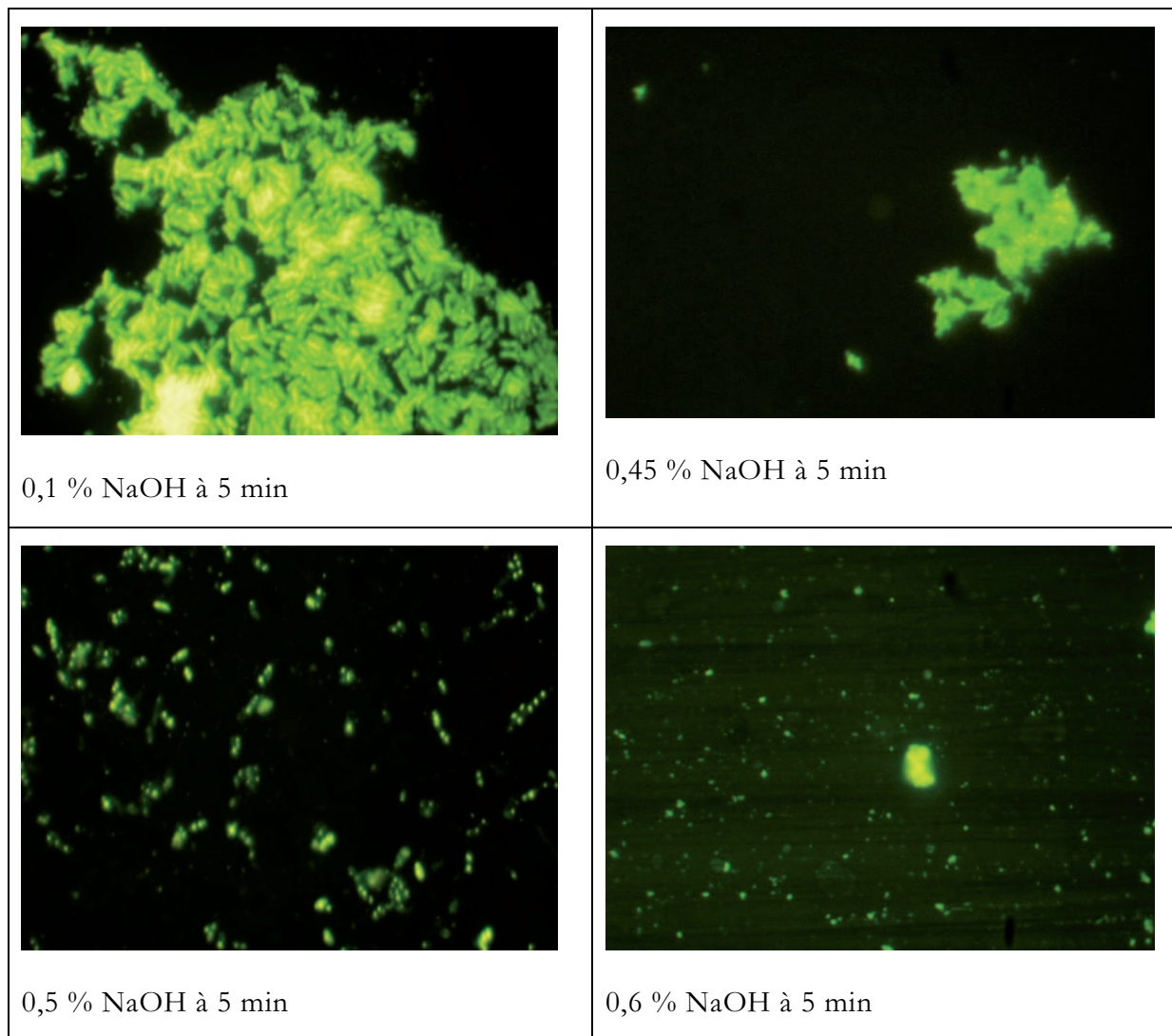


Figure VI.8 : Coloration Live-Dead de biofilm récupérés des tubulures après 5 min de mise en contact avec de la soude pour les concentrations de 0,1, 0,45, 05, et 0,6 % (X100).

Cela est conforme aux observations de Gibson *et al.* (1999) qui ont constaté que les agents nettoyants commerciaux étaient inefficaces pour éliminer les biofilms de *Pseudomonas* et *Staphylococcus*. Bredholt *et al.* (1999) ont également observé que dans un système de nettoyage à basse pression, l'utilisation d'un nettoyant alcalin appliqué sous forme de mousse en combinaison avec un désinfectant (acide peracétique) s'est avérée inefficace dans l'élimination des toutes les souillures bactériennes d'une surface.

Cependant, les nettoyants alcalins employés dans les industries alimentaires contiennent parfois des additifs chlorés et des chélateurs, qui en plus de leur capacité de nettoyer, peuvent aider à dissoudre les biofilm (EPS) aux températures employées dans cette étude (Frank, J. F., 2000). Les travaux récents de Lequette *et al.* (2009) sur nettoyants

enzymatiques donnent également des pistes sérieuses pour la formulation de nettoyeurs efficaces et moins impactants pour l'environnement.

VI.7. Etude comparative de différentes conditions de nettoyage.

Dans cette partie nous nous proposons de comparer non seulement les conditions d'élimination des biofilms à *Pseudomonas fluorescens* (effet mécanique et effet chimique seuls) que nous venons de présenter en détail mais également deux conditions supplémentaires où nous avons associés effet chimique et effet mécanique (tableau VII-3). Le graphe VI.9 reprend les modèles identifiés avec l'ensemble des points expérimentaux obtenus pour chacune de ces conditions (annexe 1). Il y a une différence évidente entre l'action mécanique à 0,144 Pa et l'association soude et action mécanique. Cette constatation est tempérée par le fait d'une part que à 0,144 Pa pour la contrainte pariétale moyenne, les résultats sont proches d'un simple trempage et d'autre part par le fait que de la soude seule se révèle au moins aussi efficace avec ou sans cette action mécanique douce. Par ailleurs, pour une concentration en soude de 1%, l'efficacité d'élimination du biofilm est clairement améliorée et comparable pour la première phase à une action mécanique forte (voir résultats obtenus à 20 Pa). En revanche ce qui diffère, c'est le maintien d'une contamination viable sur la surface des tubes au moins sur les 30 min d'essai. Cela confirme encore une fois le potentiel de résistance de ces biofilms.

Tableau VI.3 : Paramètres du modèle diphasique des différentes conditions comparées.

Contrainte(Pa)		0,144 Pa	0.5% NaOH	0.5% NaOH à 0,144 Pa	1 % NaOH à 0,144 Pa
	f	0,991	0,999	0,999	1,00
Paramètres	$K_{\max 1} (s^{-1})$	3,83	8,93	3,25	14,70
	$K_{\max 2} (s^{-1})$	0,07	0,13	0,18	0,01

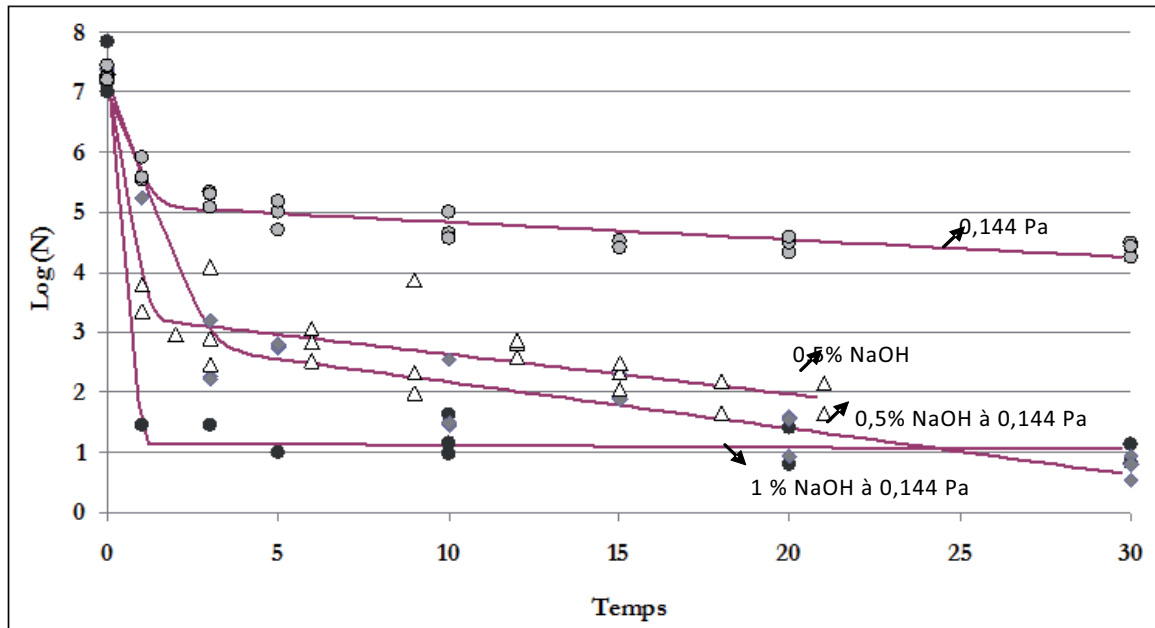


Figure VI. 9 : Graphes comparatifs des cinétiques réalisées à (0,144 Pa), (0,5% NaOH), (0,144 Pa à 0,144 Pa) et à (1% NaOH à 0,144 Pa).

Cette étude a permis de montrer l'importance de la force de cisaillement dans la désorganisation et l'arrachement des couches superficielle des biofilms. Ainsi, plus de 99% de la population bactérienne adhéree est éliminée par le rinçage confirmé par des observations directes des biofilms. Les auteurs dans la littérature ont souvent souligné la résistance des biofilms aux biocides. Cette résistance est liée à la structure complexe des biofilms et à la présence d'EPS qui joue le rôle de barrière à l'action de ces molécules en les inactivant. Le meilleur exemple est l'eau de Javel qui perd très rapidement son efficacité avec l'augmentation de matière organique à la surface des matériaux ou équipements traités. La réponse à une bonne utilisation des désinfectants est l'accessibilité des cellules (Frank & Koffi, 1990). Cela n'est possible que via le nettoyage des surfaces qui, s'il n'élimine pas toute la contamination, la rend plus vulnérable aux biocides.

Chapitre VII : Etudes des cinétiques d'élimination des biofilms à *Bacillus*.

Résumé

*Un enjeu majeur pour les industries alimentaires est l'hygiène des lignes de production grâce à l'élimination complète de résidus d'aliments et de contaminants microbiens afin d'éviter toute contamination croisée des aliments transformés. Les souches de *Bacillus* sont fréquemment isolées des lignes de transformation alimentaires et des aliments. Leur présence dans les lignes de transformation est soupçonnée être liée à la formation de biofilms en surface des équipements ou des ateliers. Par conséquent, l'observation de niveaux élevés de sporulation dans les biofilms de *B. cereus* observés permet d'envisager une augmentation significative du risque de contamination des circuits et in fine des aliments transformés.*

*Le but de cette étude est de modéliser la cinétique d'élimination de biofilms de trois souches de *Bacillus* isolées soit de l'environnement, d'aliments ou encore de patients souffrants de symptômes diarrhéiques. Comme pour *Pseudomonas fluorescens*, nous avons comparé le nettoyage en conditions statiques (action chimique, NaOH 0,5%, 60°C) au rinçage (action mécanique, 2 Pa, 40°C) et l'effet combiné des deux actions.*

*La formation des biofilms de *Bacillus* a été réalisée sur des coupons en acier inoxydable pendant 48 heures à 25°C dans des conditions statiques. L'évolution des fractions du biofilm sous formes végétatives et formes sporulées est identifiée en fonction du temps. Des observations sous microscope à épifluorescence des lames d'acier a permis de visualiser cette évolution des biofilms pour des temps particuliers.*

Ainsi, nous avons observé quelque soient les conditions de détachement, qu'une diminution rapide de la population a lieu au cours des premières 5 min. Nous n'avons pas vu de différences entre un nettoyage statique (action chimique) et un rinçage (action mécanique) dans les conditions testées, en revanche la combinaison des deux actions conduit à une réduction décimale de 3 log au lieu de 2 log lorsque ces actions sont dissociées. Plus intéressant est le fait qu'après 5 minutes il n'y ait plus ou pratiquement plus de décrochement, le biofilm résiduel contenant à la fois des cellules végétatives et des spores. Cette observation dans le cadre de l'amélioration de l'hygiène dans les industries de production alimentaires a des conséquences importantes sur les moyens de lutte contre ces contaminants indésirables.

VII.1. Analyse des biofilms de *B cereus* biofilms

L'organisation spatiale des biofilms a tout d'abord été observée par microscopie à épifluorescence. Comme le montre la figure VII.1, les cellules végétatives apparaissent colorées en orange et les spores en vert. En effet ce sont des formes dites dormantes donc métaboliquement non actives et par ailleurs ici légèrement plus petites que les cellules végétatives indiquées par des flèches blanches. Les zones diffuses entourant les cellules sont probablement composées d'EPS. Ces zones entourant les cellules CCL9 sont facilement observées. Les cellules de 98/4 semblent au contraire dépourvues de ce matériel. Il a déjà été signalé que les souches de *Bacillus cereus* produisent de petites (voire aucune) quantités d'EPS dans les biofilms (Simoes *et al.*, 2007). Quelle que soit la souche, les biofilms sont répartis sur la surface de l'acier inoxydable et l'on observe aussi bien des cellules isolées que des amas ou des grappes organisées dans un réseau apparent en formes bidimensionnelles ou tridimensionnelles suivant les zones observées. Cependant, CCL9 semble croître en grappes de plus grandes tailles que les deux autres souches, avec des structures tridimensionnelles régulièrement réparties, probablement résultant de la présence d'EPS suggéré ci-dessus.

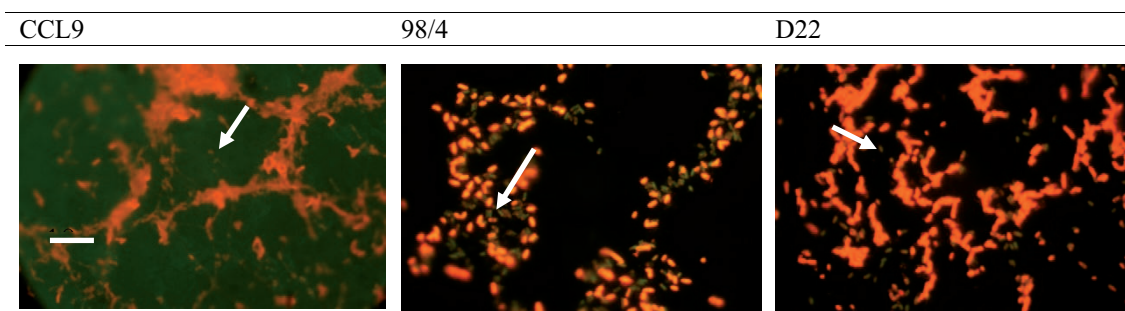


Figure VII 1. Observation du biofilm de *Bacillus* à 48h par microscopie à épifluorescence sur des coupons en acier inoxydable (x 100)

VII.2 : Cinétique d'élimination des Biofilms de *Bacillus*.

Trois souches de *Bacillus* d'origines très diverses ont été sélectionnées pour réaliser cette étude. La méthode de formation du biofilm, de dénombrement et de visualisation des bactéries résiduelles a été décrite dans les chapitres V et VI.

Pour identifier la cinétique d'élimination bactérienne, les temps suivants ont été choisis: 1, 3, 5, 10, 15, 20 et 30 min. GInaFiT (Geeraerd A.H, *et al.*, 2005) a été utilisé pour modéliser les cinétiques d'élimination des biofilms. Un modèle en deux phases, équation (II.7) de (Bournes & Jennings, 1963), a été proposé comme dans l'étude réalisée avec les biofilms de *Pseudomonas*. Les tableaux 1, 2 et 3 représentent les résultats moyens des paramètres des différentes conditions cinétiques étudiées. Les critères d'ajustement calculés sont présentés en annexe 6.

Une analyse de ces paramètres sera effectuée à l'aide du modèle linéaire général du logiciel SAS V8.0 (SAS Institute, Gary, NC, USA). Pour les deux constantes d'élimination k_{max1} et k_{max2} et f , une analyse de variance et un test de comparaison multiple de Tukey ont été réalisés afin de déterminer l'influence possible des conditions de détachement des différentes souches (trois expériences indépendantes et trois répétitions).

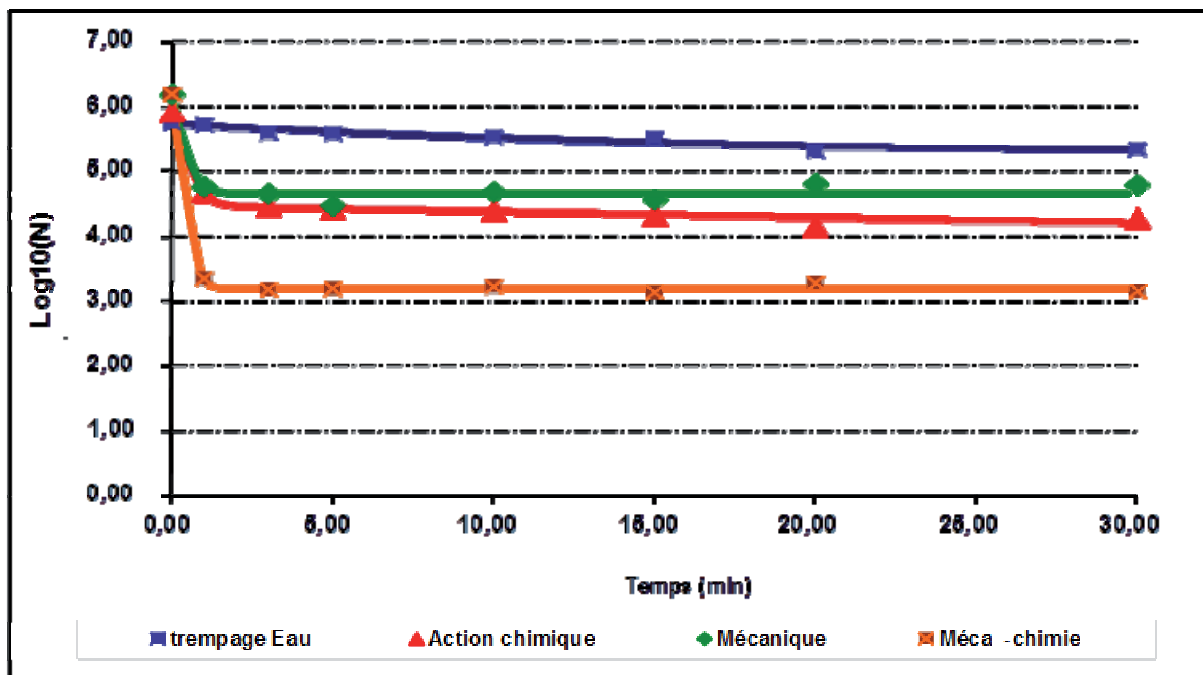


Figure VII.2 : Représentation des cinétiques de nettoyage des 4 conditions testées en fonction du temps avec *B. Sp* CCL 9.

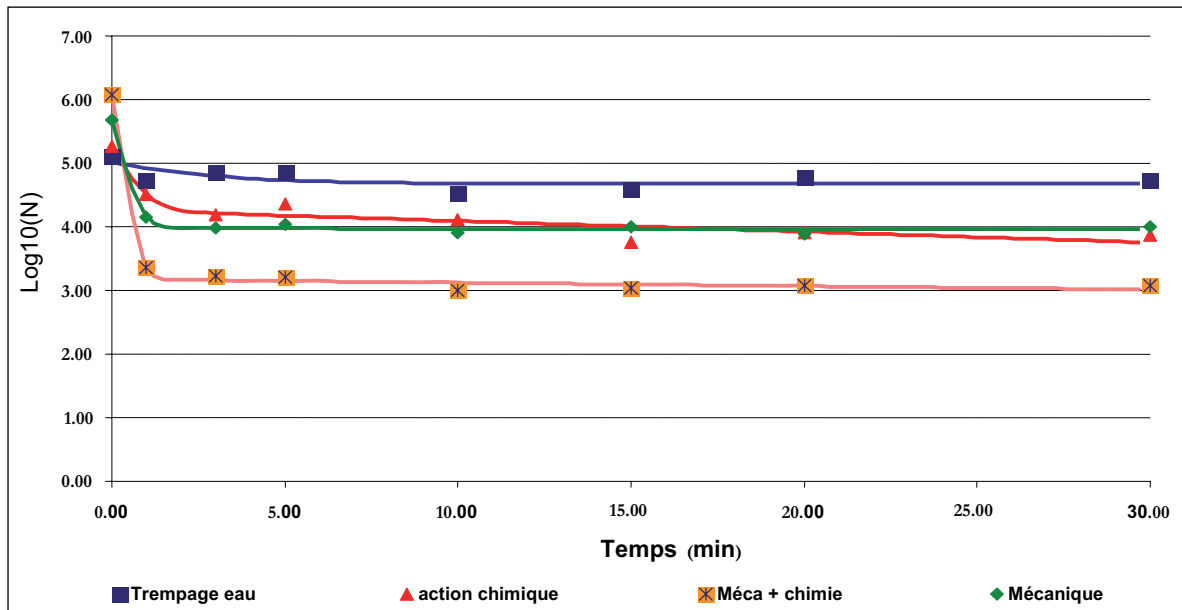


Figure VII.3 : Représentation des cinétiques de nettoyage des 4 conditions testées en fonction du temps avec *B. cereus* 98/4.

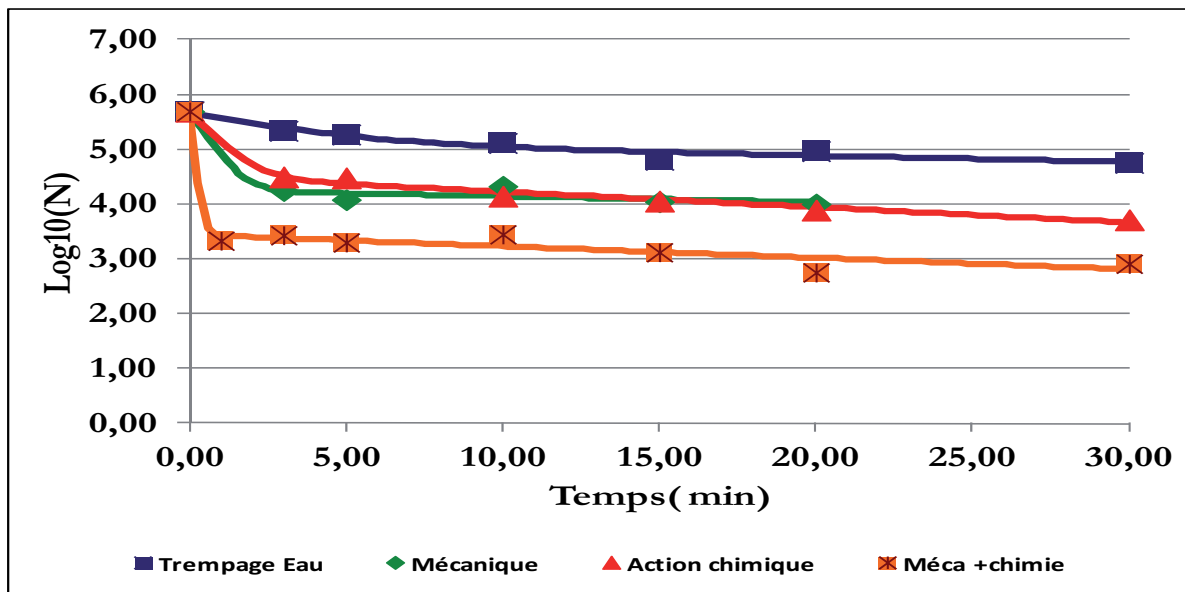


Figure VII.4 : Représentation des cinétiques de nettoyage des 4 conditions testées en fonction du temps avec *B. cereus* D 22.

Les figures VII-2 à VII-4 présentent les courbes cinétiques identifiées pour l'ensemble des conditions expérimentales étudiées et cela pour le biofilm total (spores et cellules végétatives). Nous observons comme pour *Pseudomonas fluorescens* des évolutions en deux phases distinctes et les critères d'ajustement pour le modèle choisi sont bons avec des

coefficients de corrélation variant de 0,52 à 0,99. Les paramètres présentés dans les tableaux suivant ont été identifiés sur un ajustement prenant en compte l'ensemble des points par condition expérimentales. Pour l'analyse de variance, nous avons choisi de modéliser l'essai par essai.

La moyenne des résultats des différents essais sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau VII.1 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec la souche *B. Sp* CCL 9.

<i>B. Sp</i> CCL 9					
Paramètres	Log(N ₀)	K _{max1} (s ⁻¹)	K _{max2} (s ⁻¹)	f	R ²
Conditions					
Trempage Eau	5,73	0,09	0	0,6406	0,9031
Trempage chimique	5,92	3,73	0,02	0,9648	0,9880
Mécanique	6,20	4,90	0	0,9707	0,9618
Mécanique + chimique	6,20	7,81	0	0,9990	0,9984

Tableau VII.2 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec la souche *B. cereus* 98/4.

<i>B. cereus</i> 98/4					
Paramètres	Log(N ₀)	K _{max1} (s ⁻¹)	K _{max2} (s ⁻¹)	f	R ²
Conditions					
Trempage Eau	5,01	0,43	0	0,5387	0,5242
Trempage chimique	5,27	2,44	0,04	0,9030	0,9333
Mécanique	5,68	4,54	0	0,9795	0,9943
Mécanique + chimique	6,08	7,33	0,01	0,9987	0,9940

Tableau VII.3 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec la souche *B. cereus* D 22.

B. cereus D 22					
Paramètres	Log(N ₀)	K _{max1} (s ⁻¹)	K _{max2} (s ⁻¹)	f	R ²
Conditions					
Trempage Eau	5,68	0,33	0,03	0,7318	0,9456
Trempage chimique	5,69	1,43	0,06	0,9357	0,9906
Mécanique	5,70	2,01	0,02	0,9643	0,9761
Mécanique + chimique	5,69	6,15	0,08	0,9944	0,9584

Nous constatons que la quantité de bactéries présente dans les biofilms à *Bacillus* est plus faible (jusqu'à 100 fois moins) que celle présente dans les biofilms à *Pseudomonas* précédemment étudiés.

Par ailleurs, quelles que soient les conditions de détachement, l'analyse des paramètres cinétiques montre deux phases de décrochement comme pour *Pseudomonas*. Le décrochement du biofilm le plus important est réalisé au bout d'une minute. Cette première phase est délicate à évaluer au travers de notre système expérimental et pour des observations sur des temps plus courts il faudrait envisager des techniques que nous n'avons pas encore mises en œuvre dans ce cas particulier comme les techniques de microfluidique disponibles maintenant au laboratoire. Une autre grande différence avec *Pseudomonas* est une plus grande résistance au trempage avec moins d'un log de décrochement au bout de 30 min et cela pour les 3 souches. Par ailleurs, le trempage n'a pratiquement aucun effet sur les biofilms à *B. cereus* 98/4. La deuxième phase diffère également si l'on compare aux cinétiques de décrochement de *Pseudomonas*. En effet, il n'y a pas ou peu de décrochement suivant les conditions et les souches.

En revanche, comme pour *Pseudomonas*, les actions chimiques et mécaniques seules sont comparables pour les 3 souches testées. En revanche la combinaison des deux actions est

clairement plus efficace. La réduction décimale dans tous les cas atteint un maximum de 3 log.

Le paramètre f dépend significativement des conditions d'arrachement ($Pr < 0,007$) et le test de Tuckey en séparant en deux classes distinctes les cinétiques avec et sans action mécanique montre que la part de la population majoritaire (au même comportement) du biofilm est plus élevée lorsqu'il y a action mécanique. La constante de vitesse K_{max1} varie de façon très significative avec les conditions d'élimination et avec le type de souche ($Pr < 0,0001$). Trois classes (comparaison multiple de moyennes) D22 (lettre A), CCL9 (lettre AB) and 98/4 (lettre B), 98/4 présentant les valeurs les plus faibles de K_{max1} ($3,6 s^{-1}$). Par ailleurs, comme observé sur les figures VII.2 à VII.4, l'analyse statistique confirme la différence significative entre action mécanique combine à l'action chimique par rapport aux actions chimiques et mécaniques seules et non significativement différentes. Les valeurs prises par K_{max1} , (s^{-1}) (tableaux VII-1 à VII-3) sont relativement plus faibles que pour *Pseudomonas* ce qui traduit a priori une plus grande résistance du biofilm aux conditions d'éliminations choisies. Une présentation de l'évolution du paramètre K_{max1} (s^{-1}) pour les différentes souches et les différentes conditions testées est présentée sur la figure VII-5.

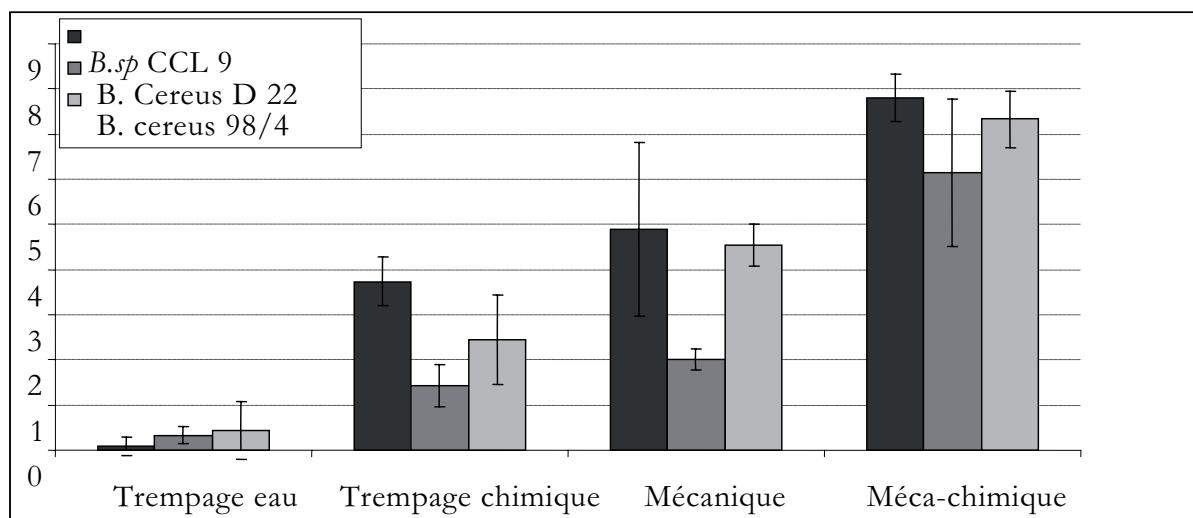


Figure VII. 5 : Représentation graphique de K_{max1} (s^{-1}) en fonction des conditions testées des trois différentes souches bactériennes.

Avec un K_{max1} de 9,2 ce paramètre atteint des valeurs proches de celles obtenues avec les biofilms à *Pseudomonas*. Un tel comportement n'est pas surprenant et est conforme aux observations sur le nettoyage des souillures issues d'aliments en général.

Plus étonnantes sont les valeurs prises par $K_{\max 2}$ qui sont quasiment nulles pour les deux souches présentes potentiellement en industrie (CCL9 et 98/4). Cela signifie que la population résiduelle après 1 minute de nettoyage n'évolue plus. La souche hospitalière D22 continue à se décrocher mais le décrochement est comparable à ce que nous avons observés avec *Pseudomonas fluorescens*.

VII.3 : Détermination de la proportion de spores

Les TVC (quantité totale de bactéries viables et cultivables) [B] et la quantité de spores [S] sont présentés sur la figure VII.6, à l'aide de représentation de boîte de parcelles. Ces boîtes représentent une variation de 50 % des données et les lignes droites sont les valeurs médianes. Les étoiles correspondent aux données aberrantes. Ainsi, nous pouvons visualiser la variabilité observée pour chacune des souches. La souche CCL9 ($9,3 \cdot 10^5$ ufc.cm⁻²) En plus de la comparaison de la capacité des souches à former des biofilms, il est bien de noter que la plus grande valeur de cellules TVC (valeur médiane) est obtenue avec les biofilms de CCL9 et la valeur la plus basse sur les biofilms de 98/4 ($1,9 \cdot 10^5$ ufc.cm⁻²). Finalement, nous pouvons dire que le pourcentage de spores formées donc résiduelles dépend de la souche comme illustré dans la figure ci-dessous.

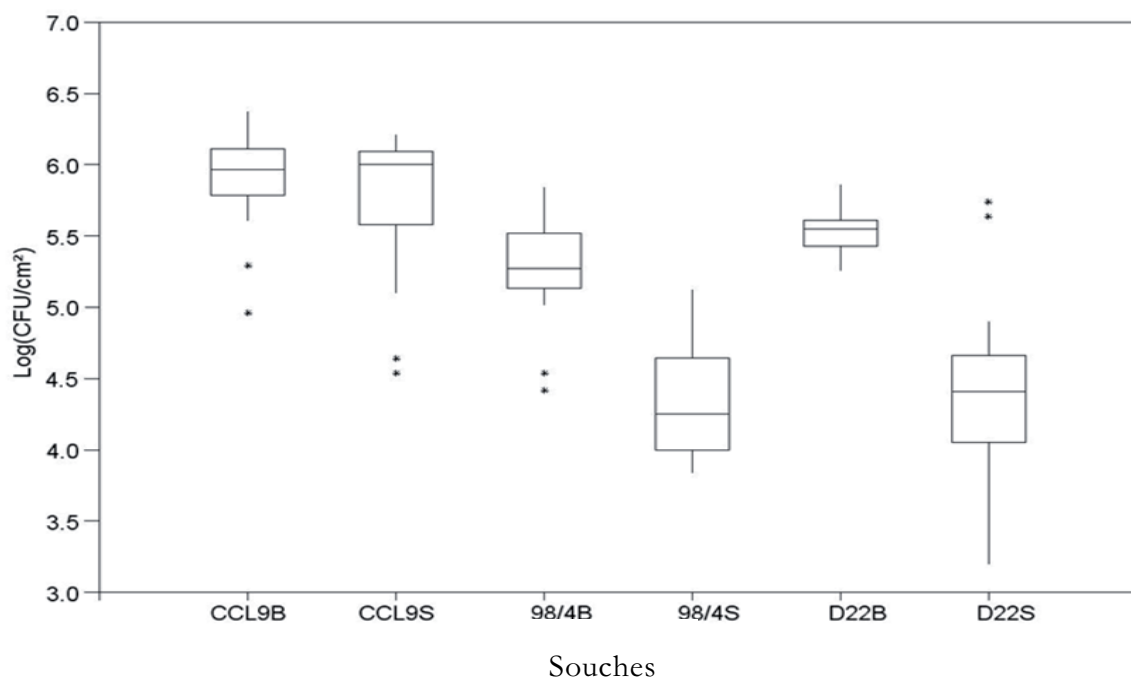


Figure VII. 6. Représentation sous forme de boîtes à pattes des quantités de cellules viables et cultivables (B) et de la fraction sporulée (S) au sein des biofilms à *Bacillus* étudiés.

VII.4 : Cinétiques d'élimination de la fraction sporulée

Dans le chapitre méthodes, la quantification des spores résiduelles a été décrite. Une variabilité relativement grande de la fraction de spores a été observée sur le biofilm initial. Cette proportion de spores varie de 12% (D22) à 98% (98/4 dans le biofilm initial. Comme dans toutes les études réalisées, l'arrachement de la fraction sporulée se déroule en deux phases. Toutefois, l'observation de l'élimination de la fraction sporulée montre que peu ou pas d'élimination a lieu après les premières minutes comme le montrent les figures 7, 8 et 9. Nous retrouvons un schéma identique à celui de l'arrachement du biofilm total avec 2 phases d'élimination.

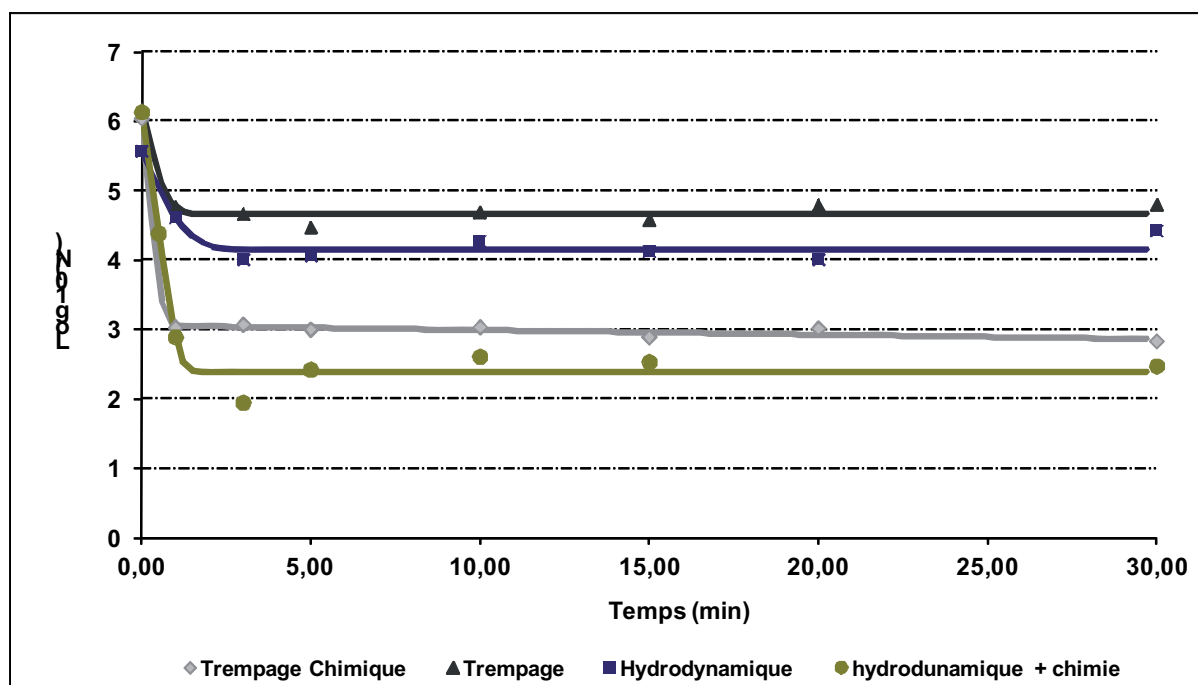


Figure VII.7 : Représentation des cinétiques de nettoyage de la fraction sporulée des 4 conditions testées en fonction du temps avec *B. sp* CCL 9.

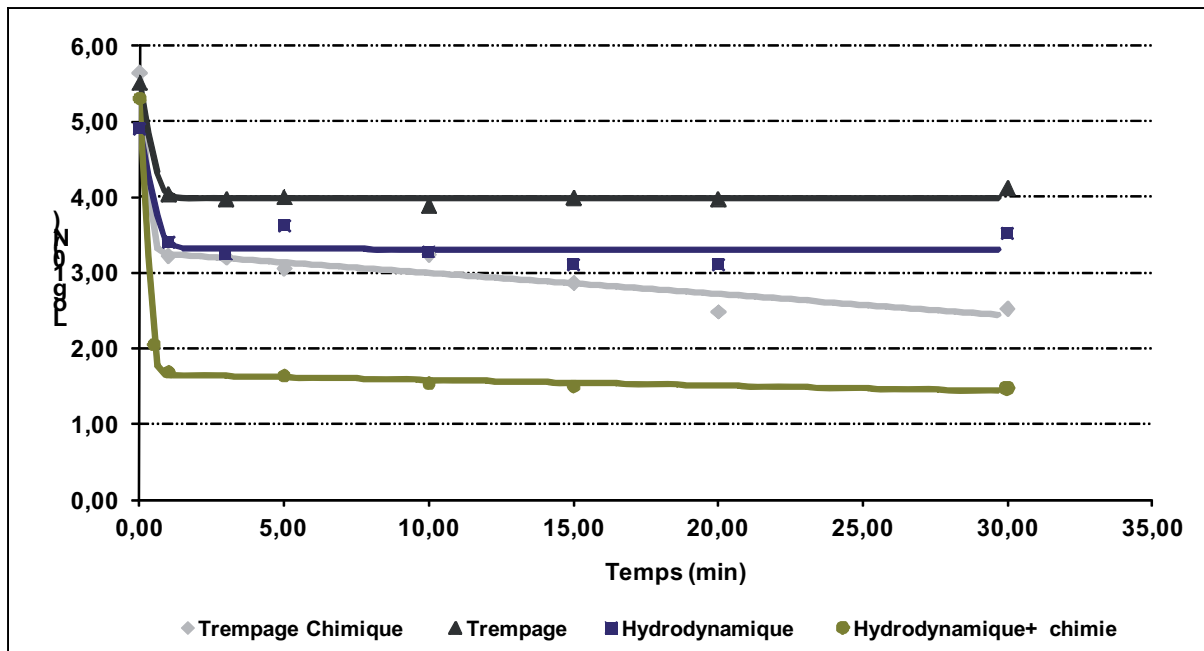


Figure VII.8 : Représentation des cinétiques de nettoyage de la fraction sporulée des 4 conditions testées en fonction du temps avec *B. cereus* D 22.

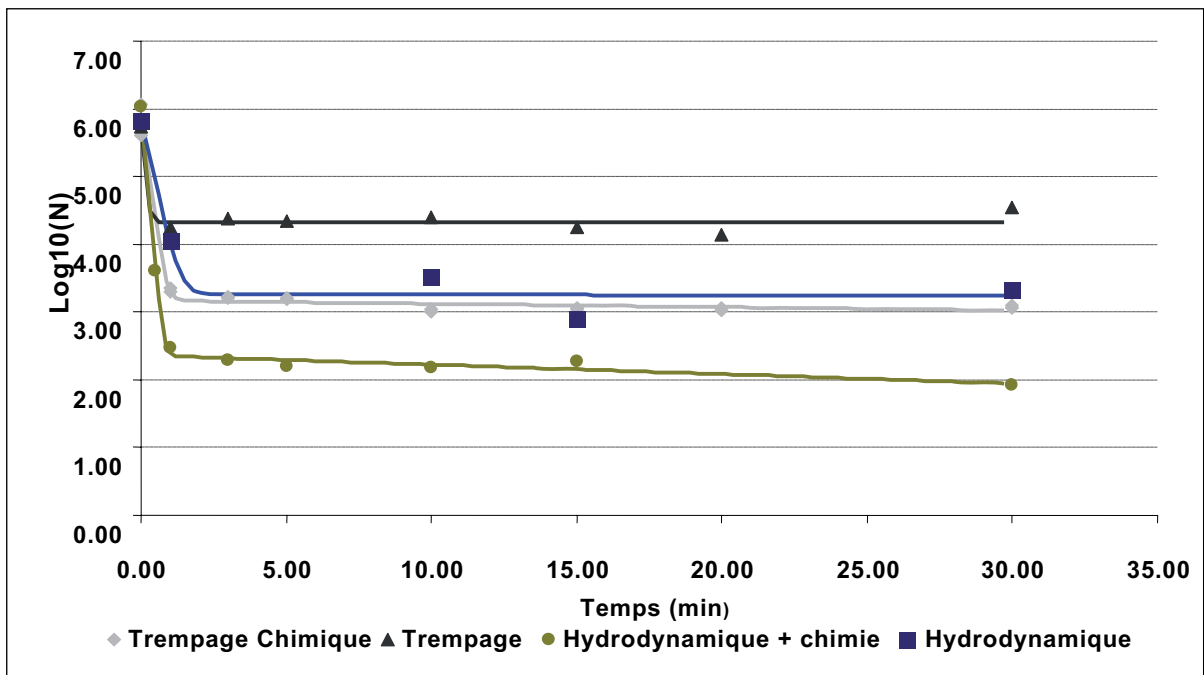


Figure VII.9 : Représentation des cinétiques de nettoyage de la fraction sporulée des 4 conditions testées en fonction du temps avec *B. cereus* 98/4.

L'analyse des paramètres issus du modèle montre bien qu'une grande proportion des spores formées est éliminée dans les premières minutes. Les valeurs prises par le paramètre K_{max1} sont clairement plus élevées que dans le cas du biofilm total. En revanche, la rapidité du phénomène vient au détriment de la précision à laquelle on peut s'attendre pour identifier

cette constante de vitesse. L'analyse de variance confirme les tendances observées sur les tableaux reprenant les valeurs moyennes prises par les paramètres (tableaux VII.4 à VII.6). Le paramètre f n'est pas très sensible compte tenu des courbes cinétiques observées que ce soit pour les biofilms à *Pseudomonas* ou à *Bacillus*, mais pour la fraction sporulée il semble que l'action mécanique conduise à des valeurs statistiquement plus faibles. La sous population affectée par la première phase de la cinétique avec action mécanique seule est moins importante. Plus intéressante est l'influence significative du traitement ($P=0,002$) et de la souche ($P=0,01$) sur la valeur de K_{max1} . Nous pouvons distinguer 3 classes avec le test de Tukey: NEP [lettre A], Action chimique et action mécanique [lettres AB] et trempage [lettre B], sachant que les conditions de traitement ayant une lettre commune ne sont pas significativement différents. Il n'y a pas de variation significative de K_{max2} entre les souches et les différents traitements du biofilm. Cette constante de vitesse d'après les tableaux prend en général des valeurs nulles. Nous avons également effectué une analyse de variance sur le taux de réduction décimale à 1 et 30 min qui nous semblait particulièrement sensible dans le cas de l'élimination de la fraction sporulée du biofilm. La réduction décimale est très significativement influencée par la souche et par le traitement ($p<0,0001$ avec un coefficient de corrélation de 0,95). CCL9 semble se détacher des autres souches avec un taux de réduction décimale plus faible. Par ailleurs, l'action chimique avec ou sans action mécanique est plus efficace que trempage ou action mécanique. A 30 minutes le taux de réduction décimale ne dépend plus de la souche compte tenu de la variabilité observée, et comme à 1 minute, l'action de la soude semble un élément déterminant au détriment de l'action mécanique.

Tableau VII.4 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec les spores de la souche *B. sp* CCL 9.

Spores <i>B. sp</i> CCL 9					
Paramètres	Log(N)	K_{max1}	K_{max2}	f	R^2
Conditions					
Trempage Eau	6,17	4,72	00	0,968	0,96
Trempage chimique	5,96	10,83	0,02	0,998	0,99
Mécanique	5,57	2,6	00	0,962	0,92
Mécanique + chimique	6,13	7,89	0,00	0,999	0,97

Tableau VII.5 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec les spores de la souche *B. cereus* D 22

Spores <i>B. cereus</i> D22					
Paramètres	Log(N)	K_{max1}	K_{max2}	f	R ²
Conditions					
Trempage Eau	5,51	5,58	00	0,969	0,98
Trempage chimique	5,64	12,38	0,06	0,996	0,98
Mécanique	4,90	5,15	00	0,974	0,90
Mécanique + chimique	5,31	15,67	0,02	0,999	0,99

Tableau VII.6 : Tableau représentant les paramètres des différentes conditions cinétiques réalisées avec les spores de la souche *B. cereus* 98/4.

Spores <i>B. cereus</i> 98/4					
Paramètres	Log(N)	K_{max1}	K_{max2}	f	R ²
Conditions					
Trempage Eau	5,28	5,11	00	0,983	0,88
Trempage chimique	5,84	6,97	0,01	0,997	0,98
Mécanique	5,83	4,30	00	0,997	0,96
Mécanique + chimique	5,94	10,81	0,03	0,999	0,99

La souche CCL9 est celle qui semble d'après les observations sous microscope à épifluorescence posséder une plus grande quantité d'EPS. Cela pourrait expliquer la meilleure résistance de la fraction sporulée protégée au moins en tout début de cinétique. *B. cereus* 98/4 au cours de son développement ne produit pas d'ESP d'après Simoes *et al.* (2007) ce qui est confirmé par nos observations en microscopie à épifluorescence. Au bout de 30 min comme le montre les images en MEB (figure VII-10) pour 98/4 après traitement chimique sans action mécanique, il ne reste plus que des cellules isolées en contact direct

avec la surface. Ce sont aussi bien des cellules végétatives (flèche rose) que des spores (flèches vertes et bleues). Nous observons également des exospororia non endommagés autour des spores de 98/4 (flèche jaune). Cela confirme bien les travaux de Faille *et al.*, 2010, qui ont obtenue pratiquement 100% de spores viables avec cette souche après traitement avec NaOH à 0,5%. Sur la figure VII.10 [A], ne sont visibles que les spores.

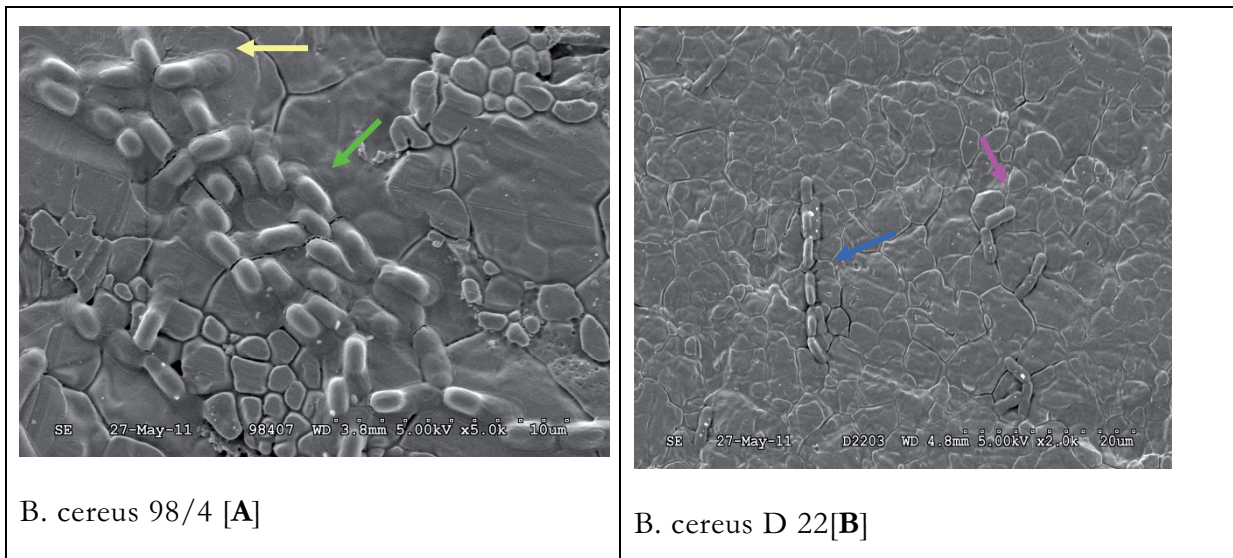


Figure VII.10 : Photographie MEB de *B. cereus* 98/4 et *B. cereus* D 22 après 30 min de trempage dans de la soude.

Dans la Figure VII.11, un exemple du suivi de la cinétique d'élimination des biofilms des trois souches est présenté ici pour un NEP (action chimique et mécanique). Il semble au vu des images que les EPS visibles dans le biofilm initial de CCL 9 sont en grande partie supprimées dans les premières minutes comme nous l'avons précédemment discuté. Cependant, avec les 3 souches on constate une forte présence de spores (colorées en vert) quelque soit la souche et quelque soit le temps de nettoyage.

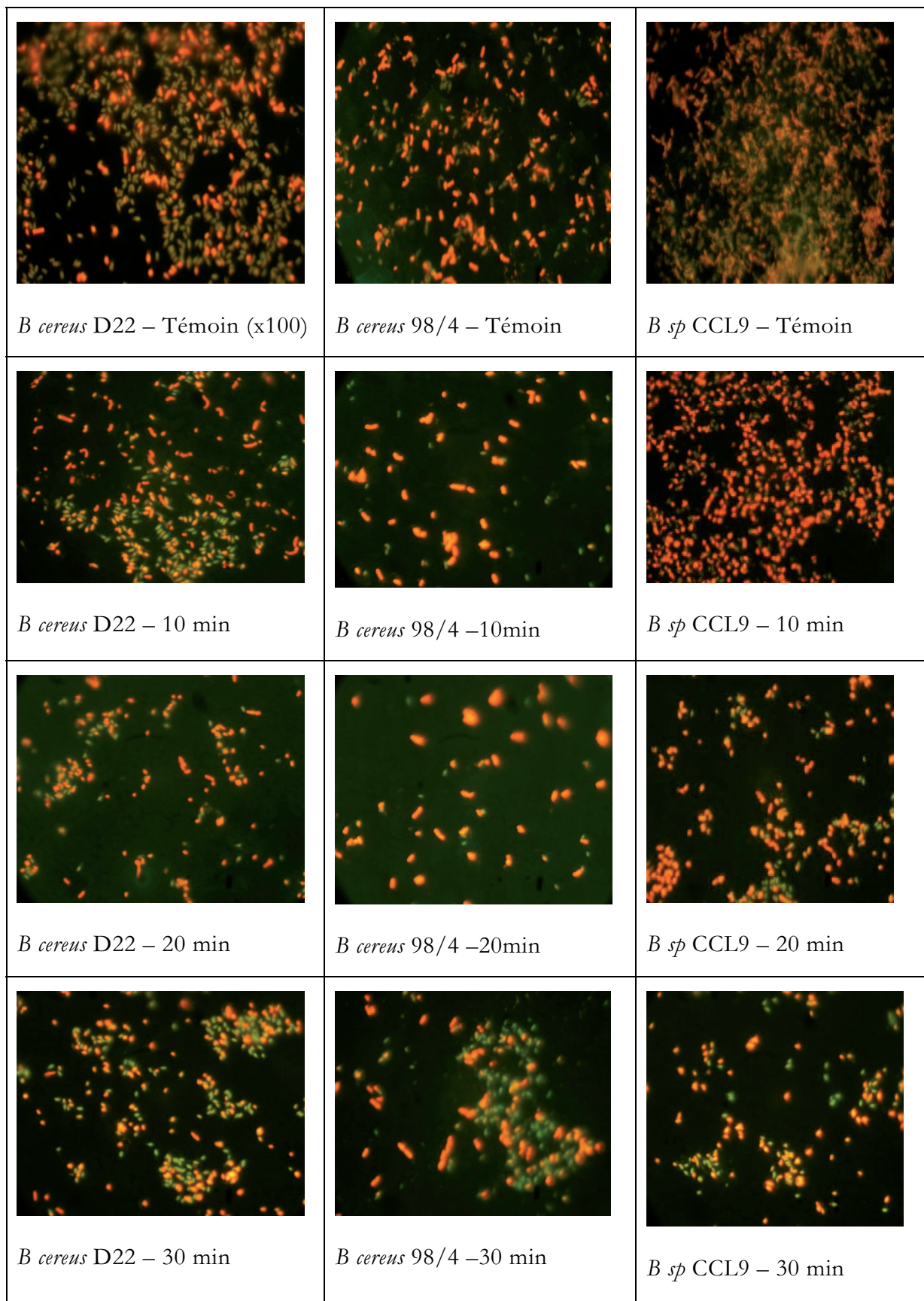


Figure VII. 11. Observation de la cinétique à 0, 10, 20 et 30 min après 30 min d'action mécanique (x 100)

En conclusion, nous pouvons dire que les trois souches de *Bacillus* testées sont capables de former des biofilms sur des surfaces en acier inoxydable. Le pourcentage de spores varie parfois jusqu'à 60 % d'une souche à l'autre. Une couverture incomplète des supports a été observée. Cependant, on a pu constater que des trois souches, seule CCL 9 produit clairement des EPS, et des clusters.

Des différences statistiquement significatives ont été observées entre les conditions d'élimination. La combinaison de l'action mécanique et chimique est plus efficace comme le traduisent les valeurs prises par le paramètre $K_{\max 1}$. Le maximum de réduction décimale atteint dans les conditions expérimentales choisies est de près de 3 log au maximum et ce quelque soient les souches testées. Ce qui est remarquable est l'absence d'élimination du biofilm après quasiment 1 minute de nettoyage. Nous avons constaté par ailleurs, que le pourcentage de spores dans ces biofilms résiduels reste très élevé. En moyenne, il reste environ 50% de spores pour 98/4, 74% pour CCL9 et 34% pour D22.

VII.5 : Cinétiques d'élimination d'un biofilm mixte *B. cereus* et *P. fluorescens* : résultats préliminaires

La colonisation des surfaces par des bactéries peut favoriser l'attachement d'autres microorganismes à cette même surface (Simões *et al.*, 2007). La diversité dans les communautés microbiennes conduit en vérité à des relations complexes impliquant des interactions inter et intra espèces. (Berry *et al.*, 2006, Hansen *et al.*, 2007 Elenter *et al.*, 2007). Les communautés bactériennes multi espèces possèdent souvent une plus grande stabilité et une meilleure résilience comparée aux communautés de chacune des espèces individuelles constituant le biofilm (Mosteller & Bishop, 1993 ; Moler *et al.*, 1998 ; Watnick & Kolter, 2000 ; Burmolle *et al.*, 2006). L'objectif de cette étude préliminaire est d'étudier le comportement de chacune des espèces bactériennes contenues dans le même biofilm lors de cinétiques d'élimination réalisées avec 0,5 % de NaOH et une contrainte pariétale de 0,144 Pa. Les temps retenus pour la cinétique sont ceux utilisé lors des précédentes études.

Trois essais ont été réalisés, les résultats sont présentés dans la figure VII.14. En 3 minutes de nettoyage, on obtient une réduction d'environ 3 log avec *Pseudomonas*, 2,5 log avec *Bacillus* et environ 1,5 log pour la fraction sporulée visualisée après traitement thermique. Toutefois, il est bien de rappeler qu'après traitement à la chaleur aucune bactérie du genre *Pseudomonas* n'est observée. Aussi, on a remarqué que dans les mêmes conditions

de traitement en biofilm mono-espèce, à 3 minutes avec la souche *Pseudomonas* une réduction de 5 log avait été obtenue, soit 2 log de plus. Quant à la souche *Bacillus*, une différence de 0,5 log est observée. Au vu de ces deux observations, on peut penser que la présence de ces bactéries au sein d'un biofilm mixte les rend plus difficiles à éliminer. A trente minutes, avec *Pseudomonas* on perd plus ou moins 5 log en biofilm mixte contre 6.5 log en biofilm mono-espèce. Aucune variation n'est observée avec la souche *Bacillus*, ou l'on obtient une réduction de 3 log comme dans le cas des biofilms mono-espèces. Le pourcentage de spore initiale du biofilm est d'environ 90%, après 30 minutes de nettoyage, elle baisse à 50% ce qui est comparable avec le biofilm mono-espèce à *Bacillus*.

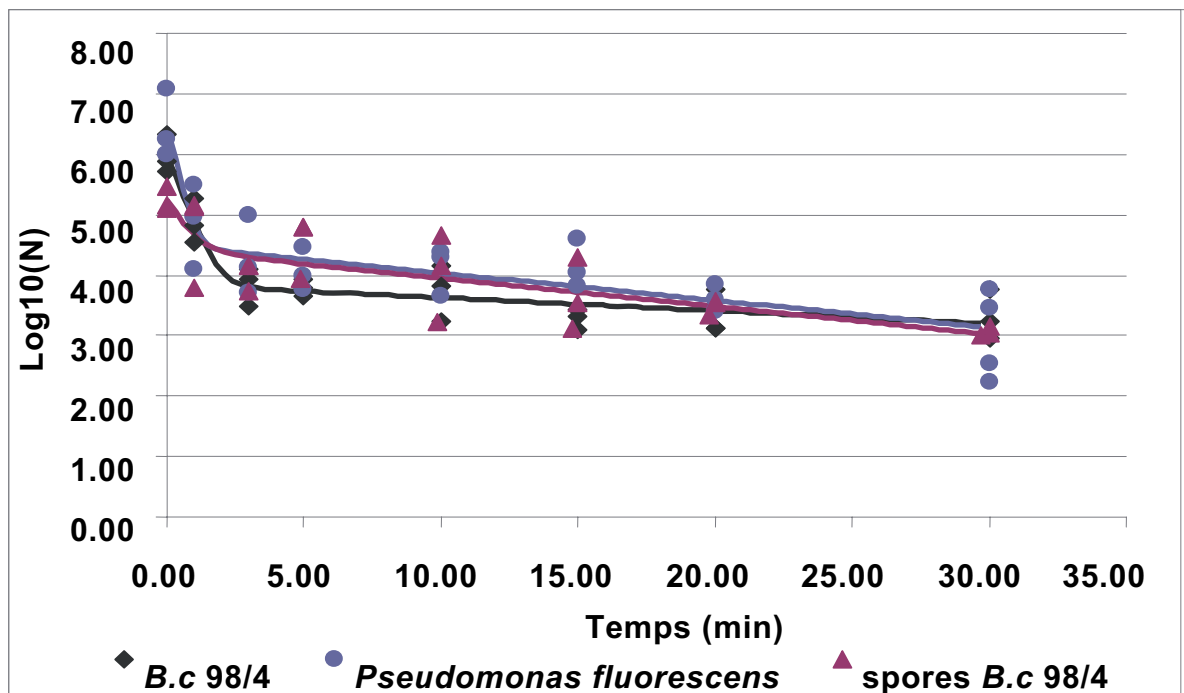


Figure VII.12 : Cinétique d'élimination du biofilm mixte à *P. fluorescens* et *Bacillus cereus* 98/4.

Tableau VII.4. Paramètre des cinétiques d'élimination du biofilm mixte à *P. fluorescens* et *Bacillus cereus* 98/4.

Biofilm mixte					
Paramètres	Log(N)	$K_{\max 1}$ (s ⁻¹)	$K_{\max 2}$ (s ⁻¹)	f	R ²
Souches					
<i>B. cereus</i> 98/4	5,97	2,59	0,05	0,992	0,89
<i>P. fluorescens</i>	6,43	4,14	0,10	0,988	0,79
Spores <i>B. cereus</i> 98/4	5,25	1,93	0,11	0,9707	0,68

L'analyse des paramètres en comparaison avec ceux obtenu avec les biofilms mono espèces des souches testées montre qu'au sein d'un biofilm mixte les souches bactériennes sont plus difficiles à éliminer. $K_{\max 1}$ pour *Pseudomonas* en biofilm mono espèce (8,93) est 2 fois supérieures à celui obtenu avec le biofilm mixte (4,14). Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenu par Simões *et al.* (2008). Dans leur étude réalisée sur *Pseudomonas* ATCC 12525^T et une souche de *B. cereus* soit individuellement cultivé ou cultivé en biofilm mixte. Cela confirme les observations des auteurs cités en début de chapitre et souligne l'importance de développer ces travaux sur biofilms mixtes.

Chapitre VIII. Récontamination bactérienne des surfaces des lignes de transformation alimentaire pendant les procédures de Nettoyage En Place.

Résumé

*La contamination possible des surfaces des lignes de transformation des aliments pendant les procédures de Nettoyage En Place (NEP) a fait l'objet de cette étude. Les essais menés étaient axés sur la contamination de surface des conduites cylindriques droites et d'une vanne bidirectionnelle, choisie comme exemple d'équipement complexe. Ces conduites cylindriques en acier inoxydable et la vanne sont insérés dans le circuit NEP de la plate-forme expérimentale en même temps qu'une série de tubes fortement contaminés par des spores de *Bacillus cereus* ayant diverses propriétés de surfaces. La procédure de NEP effectuée dans ces essais est proche de celles rencontrées dans les industries alimentaires. La récontamination de la surface qui se produit au cours du NEP a été mise en évidence, et ce, selon les propriétés de surface des spores. Le phénomène de réadhesion était contrôlé par l'écoulement et le niveau de contamination à l'intérieur de la vanne était significativement plus élevé que dans les tubes. Les stratégies de nettoyage devraient prendre en compte le phénomène de réadhesion pour limiter les risques de récontamination des lignes de production.*

VIII.1 Contexte

Il existe peu d'études sur les cinétiques de détachement de bactéries adhérentes (Herrera *et al.*, 2007 ; Lelièvre *et al.*, 2002a). Toutefois, cette approche ouvre la voie à des informations spécifiques, tels que le taux de détachement initial et également le niveau de contamination résiduelle. En effet, Lelièvre *et al.*, 2002 ont étudié les cinétiques de nettoyage des spores de *B. cereus*. Ils observent la présence d'une asymptote pour la cinétique de décrochement après adhésion des spores dans différentes conditions, avec un nombre significatif de cellules viables et cultivables même après 30 min de nettoyage avec une solution d'hydroxyde de sodium de concentration 0,5 % à 60 °C. Ainsi, ces auteurs ont émis l'hypothèse que certaines spores détachées étaient susceptibles de récontaminer les surfaces en aval au cours d'une procédure de NEP.

A notre connaissance, aucune autre attention particulière n'a été portée dans la littérature à ce genre de contamination. Cependant, certains micro-organismes, tels que les spores de *Bacillus* très résistants sont capables de survivre à la plupart de conditions rencontrées au cours des procédures de NEP : contraintes mécaniques fortes en raison des forces de cisaillement (Faille *et al.*, 2007) ou encore un environnement chimique défavorables (pH élevés ou très faibles) combinés à des températures élevées. Cependant lorsque ces bactéries sont soumises à de fortes contraintes de cisaillement, la membrane ultrapériphérique (exospore) des spores survivantes peut être manquante ou endommagée, affectant a priori la capacité de spores à adhérer fermement aux surfaces inertes (Faille *et al.*, 2010).

L'objectif de cette partie qui a été publiée par Faille *et al.* (2010) est de mener une étude sur la réadhésion possible des spores de *B. cereus* pendant une procédure de NEP dans des conditions proches de celles rencontrées dans les industries alimentaires. Au cours du nettoyage d'un équipement contenant des souillures bactériennes constituées de spores de *B. cereus*, les spores décrochées sont potentiellement capables de contaminer l'installation en aval. Nous avons choisi, pour ce fait, trois souches. Ces souches, caractérisées par des propriétés de surface différentes ont été utilisées afin de déterminer si le niveau de réadhésion est guidé par les propriétés de surfaces bactériennes. L'importance de la géométrie de l'écoulement sur le phénomène de réadhésion a été étudiée grâce à un positionnement des différents tubes dans le circuit de nettoyage à différentes positions dans la boucle et un matériel complexe (vanne bidirectionnelle).

VIII.2. Etude de la cinétique de détachement des spores de différentes souches de *Bacillus*

Nous avons tout d'abord étudié les cinétiques de détachement des spores de *B. cereus* de trois souches (figure VIII.1) afin de vérifier si les spores adhérentes sont encore observées après une procédure entière de NEP et de comparer le niveau de spores résiduelles entre les souches. Trois souches ont été testées, *B. cereus* ATCC 14579^T, *B. cereus* CUETM 98/4 et *B. cereus* 5832. Toutes les spores de *B. cereus* présentent des propriétés communes comme une membrane extra périphérique ample appelée exospores, des appendices et un caractère hydrophobe. Toutefois, selon la souche, la longueur et le nombre d'exospores et la longueur des appendices (Tauveron *et al.*, 2006), ainsi que le

caractère hydrophobe (Andersson & Ronner, 1998) peut varier considérablement, et ces diverses propriétés sont suspectées de jouer un rôle majeur dans l'adhérence des spores et la résistance au nettoyage (Tauveron *et al.*, 2006). *B. cereus* 98/4, qui est hautement hydrophobe est entourée de nombreux appendices, *B. cereus* 5832 possède un grand exosporium et de courts appendices et *B. cereus* ATCC 14579^T possède des propriétés intermédiaires.

En préambule, nous pouvons dire que à l'instar de Tauveron *et al.*, (2006), les trois souches testées présentent différentes capacités d'adhérer en acier inoxydable. L'analyse de la variance confirme d'ailleurs cette observation sur le niveau initial d'adhésion des spores (valeur $p < 0,0015$). En effet, le nombre de spores adhérentes de *B. cereus* 98/4 est deux fois plus élevé que celui des deux autres souches, comme le montre la comparaison multiple de moyennes (test de Tuckey). Nos résultats sont conformes à ceux de Tauveron *et al.* (2006) qui ont montré que, lorsque l'adhésion a lieu en conditions statiques, plus on a un nombre important d'appendices autour de la spore, plus le taux d'adhésion n'est important. Comme indiqué plus haut, les spores de *B. cereus* 98/4 sont entourées par de longs et nombreux appendices tandis que les spores de *B. cereus* 5832 quant à elles sont entourées de seulement trois courts appendices (Figure VIII.1).

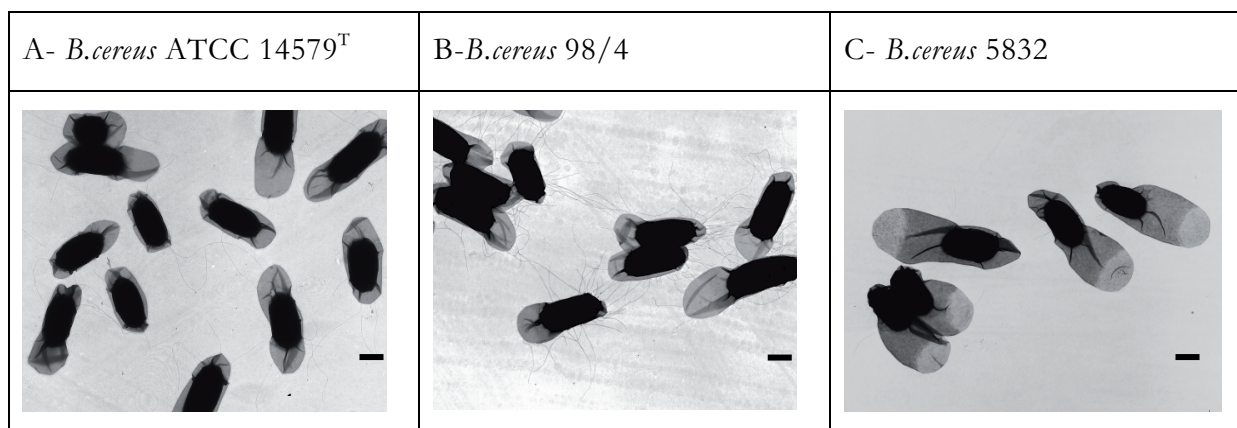


Figure VIII. 1. Photographie MEB des spores de *Bacillus* utilisée lors de l'étude

Les expériences de décrochement ont été réalisées avec 20 tubes cylindriques sans soudure en acier inoxydable (316 L, fini recuit brillant) de $20 \cdot 10^{-2}$ m en longueur et $2,37 \cdot 10^{-2}$ m un diamètre intérieur. Ces tubes ont été souillés par des spores de *B. cereus* en suspension dans l'eau adoucie, à 10^4 ufc.ml⁻¹ pendant une heure dans des conditions statiques, à la température ambiante.

La procédure de NEP et la méthode de détection des spores résiduelles sont présentés dans la partie Matériel et méthodes. Les résultats sont présentés dans le graphique ci-dessous.

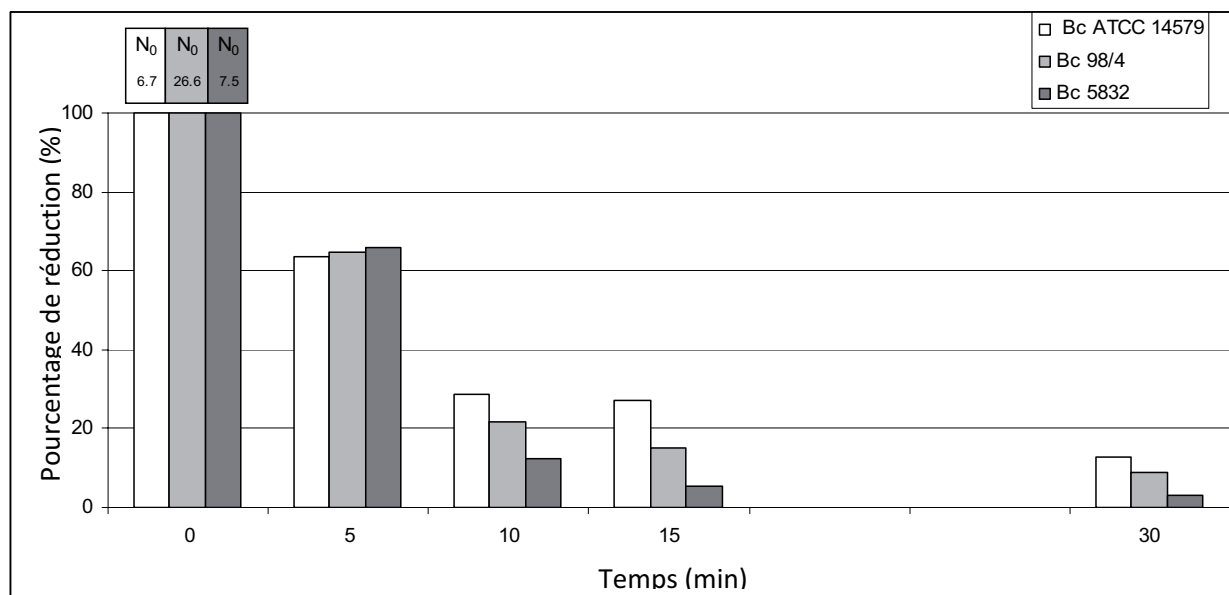


Figure VIII.2 : Pourcentage de réduction bactérienne en fonction du temps.

La figure 2 illustre un ensemble typique de données expérimentales de détachement pendant le nettoyage pour chaque souche. Comme prévu, le taux de spores adhérentes a d'abord diminué rapidement avec le temps : quelle que soit la souche, plus de 75 % des spores sont détachées après un 10 min de nettoyage. Le détachement étendu sur une longue durée (30 min de nettoyage) a atteint des pourcentages de l'ordre de 3 % à 13 % de spores résiduelles adhérentes. Nous retrouvons des résultats comparables à ceux de Lelièvre *et al.* (2002a) à savoir qu'un simple ordre 1 pour la cinétique de décrochement n'est pas vrai. Nous pouvons d'ors et déjà faire l'hypothèse que l'asymptote observée est due au phénomène de redéposition. Des différences significatives ont été cependant observées entre les souches ($p < 0,0048$), les spores de *B. cereus* 5832 étant détachée plus facilement que celles de *B. cereus* 14579^T qui semblent plus résistantes. Comme suggéré par Tauveron *et al.* (2006), la dimension de l'exospore serait de plus grande importance dans la résistance au nettoyage en raison de l'effet des forces hydrodynamiques

VIII.3. Étude de la réadhésion

Pour vérifier l'hypothèse de réadhésion, 2 séries de 4 tubes ont été encrassées par les suspensions de spores de *Bacillus* dans l'eau pendant 1 h, tel que décrit dans le chapitre méthode. Pour rappel, une première série de 4 tubes est contaminée avec une suspension de spores à 10^7 ufc.ml⁻¹ et une seconde série de 4 tubes est contaminée avec une suspension de spores à 10^3 ufc.ml⁻¹. Ces deux séries de quatre tubes cylindriques sont vidangées et insérées dans l'installation pilote avec des tubes stériles, comme décrit dans la Figure V.1. Après une procédure de rinçage, les 4 tubes contaminés à 10^3 ufc.ml⁻¹ sont retirés et remplacés par 4 tubes stériles. L'installation est alors soumise à un NEP.

L'intérêt d'utiliser 4 tubes à plus faible encrassement est de pouvoir estimer la contamination initiale sur les surfaces à partir de la suspension de spores diluée ou non. En effet avec 10^3 ufc.ml⁻¹ il est possible d'effectuer un dénombrement à l'aide de moulage de gélose nutritive (voir partie Méthodes). Ainsi, en extrapolant le niveau de contamination résiduelle après nettoyage des tubes encrassés par la suspension la plus diluée, il est possible d'évaluer la contamination initiale et le nombre possible de spores détachées et « contaminantes » des tubulures contaminées à 10^7 ufc.ml⁻¹. L'estimation est de l'ordre de $5 \cdot 10^6$ ufc quelle que soit la souche utilisée.

VIII.4. Analyse et résultats expérimentaux

L'adhésion bactérienne se produit en tout lieu et à tout moment. Il semble très probable que ce phénomène pourra également survenir au cours de la procédure de NEP. Dans cette étude, nous avons examiné la possibilité de réadhésion en aval de certaines spores bactériennes qui se décrochent au cours de la procédure de nettoyage. Les conditions expérimentales utilisées dans cette étude sont proches de celles rencontrées dans les industries alimentaires (échelle pilote), contrairement à la plupart des travaux publiés qui ont été menées dans les systèmes de laboratoire comme dans les travaux de Demilly *et al.* (2006) et Perni *et al.* (2007) ou encore Guillemot *et al.* (2006) dans des systèmes classiques de chambres à flux laminaire.

Comme le montre la Figure 3, le phénomène de réadhésion a eu lieu à tous les emplacements dans la boucle d'essai, et ce quelle que soit la souche utilisé. Toutefois, le niveau de réadhésion diffère selon la souche, et l'effet de la souche est très significatif ($p < 0,0004$). En effet, la quantité de spores de *B. cereus* 98/4 ayant contaminées les tubes

initialement stériles est d'environ 1,7 fois supérieurs à la quantité de spores de *B. cereus* 14579^T. Malgré les conditions environnementales très différentes entre les différents essais et le moment de la contamination (écoulement turbulent vs statique ; eau vs NaOH 0,5 %), les spores de *B. cereus* 98/4 sont toujours parmi les spores les plus adhérentes/contaminantes.

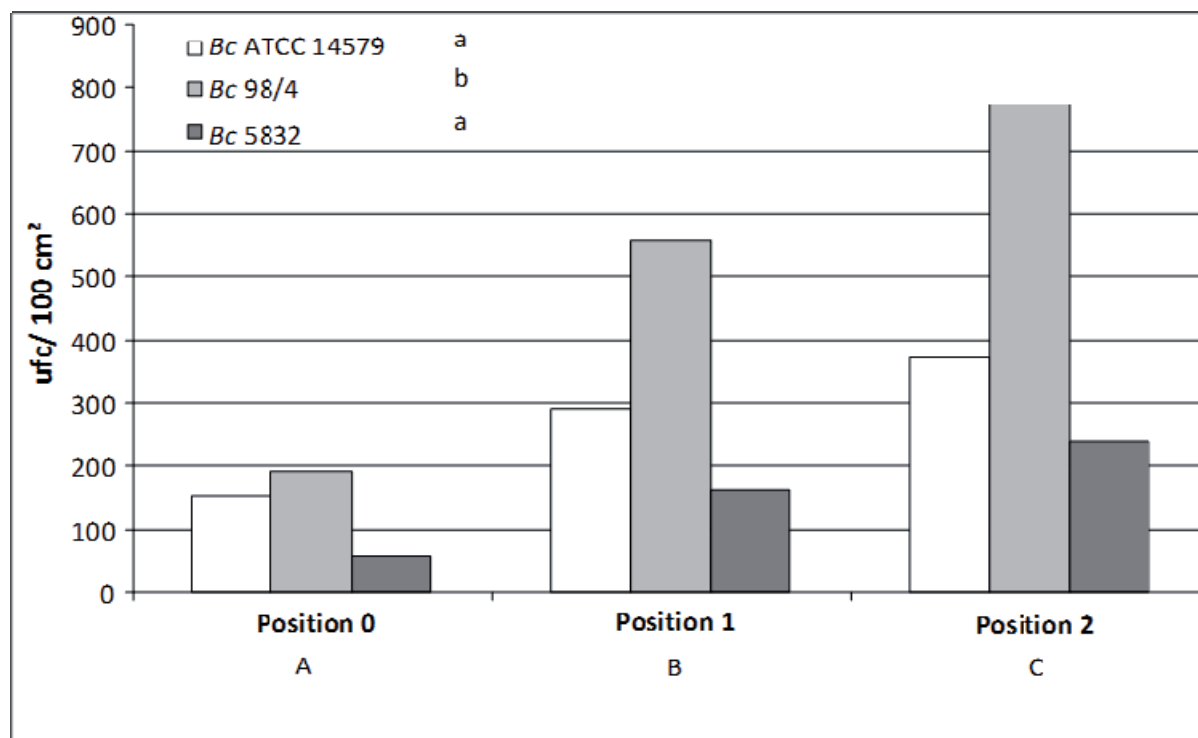


Figure VIII.3 : Quantité de cellules résiduelles en fonction du positionnement des tubes dans la boucle d'essai.

Comme prévu, la position dans la boucle joue également un rôle majeur dans le phénomène de réadhésion, quelle que soit la souche ($p < 0,0001$). En fait, la conception de matériel ou des lignes de transformation est connue pour avoir un effet considérable sur le processus de nettoyage (Blel et *al.*, 2007 ; 2008) en affectant l'hydrodynamique du fluide. Quelle que soit la souche, le niveau de contamination s'avère plus basse pour les tubes en position 0 et le plus élevé pour les tubes en position 2. Le faible niveau de contamination des tubes en position 0 pourrait s'expliquer par un effet de dilution. En effet, les spores adhérentes sur les tubes en amont de la tuyauterie fortement contaminée se situent après le réservoir de 100 l où se produit la dilution. La différence claire dans le niveau de contamination des zones en amont ou en aval de la tuyauterie contaminée suggère que la plupart des spores détachées réadhèrent très rapidement et, par conséquent, que les zones situées juste en aval des zones contaminées sont les plus sensibles à la contamination croisée au cours des procédures de

NEP. Selon Blel *et al.* (2007), les interactions entre la suspension de spores et la structure de l'écoulement turbulent pourraient expliquer que la réadhesion se produit préférentiellement à un endroit proche de la zone de détachement. Par ailleurs, les différences observées dans le niveau de contamination des conduites en position 1 et 2 peuvent refléter un arrangement des différents flux en raison de la présence d'un coude placé en amont des conduites en position 2. En effet, il a été démontré que la présence d'un coude sur une boucle peut provoquer des perturbations du flux en aval ce qui entraîne des modifications fortes lors de l'adhésion bactérienne (Blel *et al.*, 2008). Dans notre étude les longueurs d'établissement, c'est-à-dire la longueur des conduites en amont de tuyaux en position 2 ne sont pas suffisamment importantes pour assurer un flux entièrement développé, contrairement à ce qui se passe en position 1. En position 2, les perturbations de la circulation du fluide de nettoyage et les fluctuations induites par des contraintes de cisaillement faciliteraient l'accès des spores aux surfaces mais *a contrario* leur détachement des conduites. Nous observons en réalité ici un phénomène de piégeage de la contamination. À l'inverse, vu que pour les conduites en position 1 le flux est entièrement développé, l'accès aux parois lié à la diffusion dans la sous-couche visqueuse limite le phénomène d'adhésion.

En résumé, la contamination des surfaces peut se produire au cours des procédures de NEP et l'organisation des lignes de transformation favorise ou pas le phénomène de récontamination. Ici, les perturbations liées à un écoulement non établi semblent un élément défavorable. Il est également impératif de se rappeler que la quantité de spores qui « réadhèrent » est en fait la résultante de deux mécanismes concomitants, « l'adhésion et le détachement ». Ces deux mécanismes sont grandement affectés par les perturbations de la circulation du fluide nettoyant (Blel *et al.*, 2008).

Il est à noter que l'effet du produit chimique seul (30 min de traitement avec NaOH 0,5 % à 60 ° C en condition statique) peut induire des changements mineurs sur les propriétés de surface des spores, sans affecter l'intégrité de l'exospore (communication personnelle par la Faille). À l'inverse, l'exosporium peut être endommagé par de fortes contraintes de cisaillement (Faille *et al.*, 2007). Néanmoins, si la capacité des spores arrachées lors de la procédure de NEP n'est pas très différente de celle des spores non endommagées, on peut estimer que la quantité totale de spores capables de réadhérer dans la boucle (environ 10⁴ cm⁻²) pourraient varier de 1,6 10⁵ (3 %) de spores de *B. cereus* 5832 si les conditions d'écoulement étaient proches de celles rencontrées en position 1, à 2,4 10⁶ (50 %) de spores de *B. cereus* 98/4 si les conditions d'écoulement étaient proches de celles rencontrées en position 2.

VIII.5. Réadhésion à un équipement complexe : exemple de la vanne bidirectionnelle

Une vanne en acier inoxydable bidirectionnelle (2x2 voies) (AISI 316 L), largement utilisée dans les lignes de transformation alimentaire, a été utilisée pour évaluer la réadhésion dans les équipements complexes. Les essais avec la vanne ont été réalisés uniquement avec des spores de *B. cereus* 98/4. Le descriptif de vanne a été présenté dans la partie “Matériels et Méthodes”. La vanne est insérée dans le circuit entre deux tubes droits de 50 cm de longueur. Une expansion graduelle suivie d'un tube de 50 cm de longueur est placé en amont de l'entrée supérieure. Les parties supérieures et inférieures de la vanne sont connectées au circuit externe par portions tubulaires droites et coudées. Aucun échange direct n'existe entre les deux chambres de cet équipement complexe. La plate-forme, y compris la vanne est soumise à une procédure de NEP comme décrite ci-dessus. Après le nettoyage, la vanne est complètement vidangée, puis démantelée et toutes les parties à tester sont protégées avec du papier d'aluminium pour prévenir toute contamination aéroportée.

Des travaux antérieurs effectués dans le laboratoire ont montré les particularités de la contamination (encrassement et nettoyage) par des spores de *Bacillus* aussi bien de diverses portions droites avec changement de diamètres que d'équipements complexes comme le type de vanne utilisée ici (Lelièvre *et al.*, 2002b ; Blel *et al.*, 2007 ; Blel *et al.*, 2008). Palmer *et al.* (2007) ont souligné l'importance non pas seulement de la conception de l'équipement mais plus généralement de toutes les composantes du site de transformation dans la maîtrise de la contamination microbienne. Afin de démontrer que les équipements complexes favoriseraient aussi une adhésion bactérienne préférentielle au cours du NEP, la réadhésion par *B. cereus* 98/4 a été étudié sur une vanne bidirectionnelle insérée dans la boucle de nettoyage ci-dessous.

VIII.6. Analyse statistique

Une méthode décrite par Bénézech *et al.* (2002) a été utilisée pour classer les différents niveaux de contamination dans la vanne bidirectionnelle à l'aide de logiciels de S-plus (Seattle, USA). Le regroupement par la méthode de Hartigan & Wong. (1979) a permis de déterminer les "n" groupes des zones pouvant être identifiés en fonction de leur niveau de contamination. Une répartition des observations avec "n" groupes qui minimise la somme des carrés au sein du groupe, a été obtenue. Le nombre de groupes « n » obtenu dans cette

étude est égale à 3. Ainsi en supposant une distribution normale, le test de comparaisons multiples de Friedman a été ensuite effectué afin de confirmer que les 3 groupes obtenus, sont significativement différents au sein d'un même groupe. Les résultats d'indentification montrent que trois niveaux de contaminations significativement différents ont été déterminées : fortement contaminés (noir), modérément contaminés (gris foncé) et légèrement contaminés (gris clair)

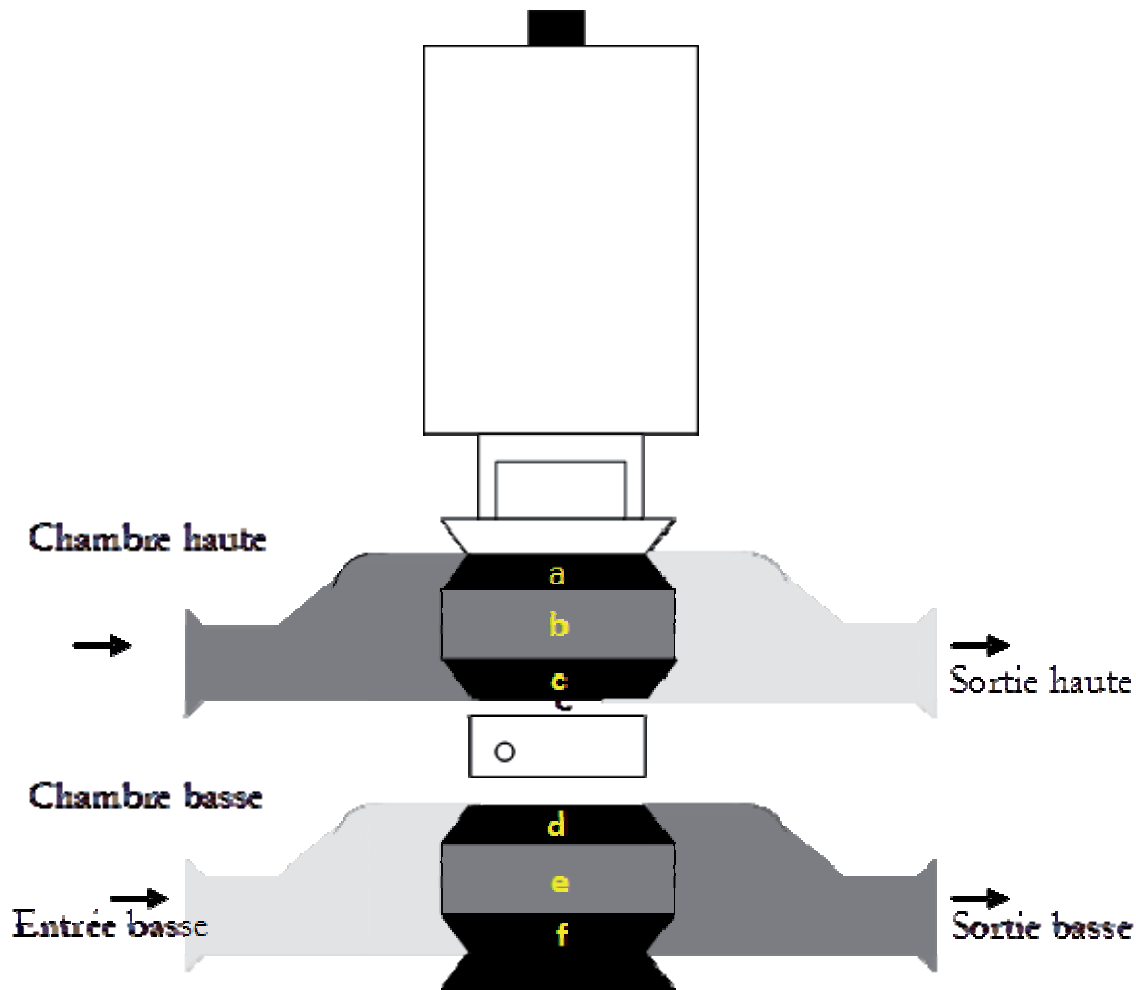


Figure VIII.4: Schéma représentant les zones de contamination dans la vanne bidirectionnelle.

Tout d'abord, même les zones les moins contaminées de la vanne étaient significativement plus contaminées que les tubulures quelles que soient leurs positions le long de la ligne de traitement. Concernant la vanne, les différences observées dépendent *a priori* de la géométrie de celles-ci. Compte tenu de travaux antérieurs sur ce type de vanne (Blel *et al.*, 2008), les zones où a été observé des zones de recirculation du flux présentent clairement des niveaux élevés de spores adhérentes (zones a, c, d et f). Dans les zones b et e (corps de

la vanne), le flux est subitement ralenti en raison de l'augmentation de diamètre, induisant en revanche un niveau intermédiaire de contamination. Des résultats similaires ont été rapportées sur l'expansion soudaine des tubes (Blel *et al.*, 2007). Les niveaux de contamination observée dans les entrées et sorties sont également importants par rapport aux contaminations observées dans les portions droites du circuit. Nous l'interprétons comme étant une conséquence des perturbations dans l'écoulement en amont et en aval dues à la présence de formes coudées.

En résumé, la vanne a été caractérisée par un niveau élevé de réadhésion des spores de *B. cereus* au cours du NEP et cela peut-être considérée comme présentant un plus grand risque de contamination des aliments. En effet, il faut garder à l'esprit l'intoxication alimentaire notoire qui a eu lieu au Japon en 2000 où 14 000 personnes ont été touchés (Watts, 2000): c'est le résultat de la contamination bactérienne d'une seule vanne reliant une conduite d'alimentation à un réservoir utilisé pour recycler les restes de lait.

Les procédures de nettoyage sont utilisées pour assurer l'hygiène des lignes de transformation par l'élimination complète des bactéries provenant des surfaces de transformation des aliments. Il est facilement concevable que certaines de ces bactéries détachées soient capables de se ré-déposer en aval. Dans cette étude, nous avons réussi à démontrer que les spores de *Bacillus* de trois souches, détachées des surfaces contaminées au cours du processus de nettoyage ont pu récontaminer les surfaces en aval. Malgré de grandes différences dans les conditions environnementales au cours de la transformation des aliments et procédures de NEP, les mêmes mécanismes peuvent être proposés (fluctuations de contraintes favorisant l'arrachement, zones de recirculation favorisant le piégeage, écoulement établi limitant la réadhésion...). Comme cela a été mis en évidence lors d'études antérieures, la forme de l'écoulement liée à la géométrie des systèmes et à l'organisation des lignes peut être à la source de création de zones ou points critiques alors qu'à *priori* les géométries incriminées et testées « à part » ne présentent aucun risque de piégeage de contaminants. Cela souligne les difficultés du concepteur d'équipements ou de lignes qui ne possède pas actuellement d'outils type système expert permettant d'intégrer toutes ces notions et assurer une aide réelle au design hygiénique.

**CONCLUSION
GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La production d'aliments sains destinés à la consommation humaine est un enjeu majeur pour les industriels. Cette production fait appel à plusieurs processus qui font intervenir : la collecte de la matière première, le stockage et la production. Chaque étape de ce processus est capital et doit être maîtrisée afin d'éviter toute forme de contamination. Dans les industries, le maintien des surfaces en contact avec les aliments doit être assuré par un processus de nettoyage complet. Cela passe par une bonne pratique des procédures de nettoyage qui doivent assurer l'élimination des souillures micro et macroscopiques des surfaces. L'élimination de ces résidus alimentaires sources de nutriments pour les bactéries est essentielle pour assurer une production saine. Le nettoyage des surfaces fermées ou ouvertes est un phénomène complexe qui fait intervenir plusieurs paramètres. Ces paramètres sont soit liés à la conception même des équipements de production (matériaux et géométrie), soit au produit alimentaire et à la contamination bactérienne qui peut s'y produire et donc être à la base d'une adhésion entre contaminants et surface de production, soit aux conditions opératoires utilisées pour le nettoyage (détergent, temps, températures). Ces dernières décennies ont vu l'émergence de savoir-faire industriel et de contraintes légales au cours de la production alimentaire. Les procédures de NEP étant une étape clé de la production, une meilleure connaissance de l'influence de ces différents facteurs s'est imposée.

Notre contribution a visé trois objectifs. Le premier objectif était d'établir plusieurs modèles de biofilm bactérien (flore d'altération, flore pathogène, combinaison des deux) construits de façon répétable et caractérisée, de réaliser des cinétiques de nettoyage et de modéliser ces cinétiques d'élimination lors du nettoyage afin de prédire les opérations de nettoyage en identifiant l'action respective des paramètres liés aux conditions de nettoyage. Un objectif secondaire était de discriminer entre les actions respectives de chaque étape ou activités intervenant dans le nettoyage à savoir le trempage (hydratation dans l'eau combinée ou non à une attaque chimique), le rinçage (action mécanique seule), le nettoyage (combinaison action mécanique et action chimique). Un troisième objectif visé plus finalisé, était de mettre en évidence le phénomène de redéposition qui se produit pendant le

processus de NEP sur les surfaces complexes ou non communément utilisées dans les industries agro-alimentaires lors de la production des aliments destinés à la consommation.

Le travail sur les cinétiques de nettoyage est basé sur le modèle d'inactivation bactérienne diphasique de Cerf. (1977) issu du logiciel GiNaFiT. Ce modèle développé à partir de considérations théoriques (Cerf., 1977) est constitué de 2 cinétiques d'ordre 1 correspondant à 2 sous-populations bactériennes distinctes au sein de la même population constitutive du biofilm. Cette approche a permis d'émettre des hypothèses et d'expliquer la réponse à modéliser par l'action de phénomènes physiques, biologiques et/ou chimiques. L'inactivation bactérienne se traduit ici par une élimination plus ou moins aisée que nous avons relié à la structure/répartition du biofilm (visualisation sous microscope), à sa composition (présence de matériels extracellulaires, présence de spores) et aux actions respectives de l'écoulement via la contrainte pariétale ou de la chimie via la concentration en NaOH.

Les résultats obtenus sur le premier modèle de biofilm à *Pseudomonas fluorescens*, ont permis de montrer que la majeure partie de l'arrachement au cours du nettoyage a lieu dans les premières minutes de nettoyage (1 à 3 min). Aussi, on a pu observer que la constante de vitesse d'arrachement $K_{\max 1}(\text{s}^{-1})$ variait linéairement avec la contrainte en paroi lors des cinétiques réalisées sous action mécanique seule (hydrodynamique). Nous avons pu montrer que l'arrachement au cours de cette phase se fait par élimination de la couche superficielle du biofilm, laissant sur la surface les cellules directement en contact avec le matériau. L'arrachement de cette couche entraîne l'élimination de toute la substance extracellulaire (EPS) éliminée avec les cellules bactériennes intégrées dans ces structures tridimensionnelles visibles même pour des biofilms relativement « jeunes » sur lesquels nous avons travaillé. L'action combinée de la chimie (soude à 0,5%) et de la force de cisaillement (0,144 Pa) conduit à un taux d'élimination maximum de 99% de la population bactérienne. Cette étude a aussi permis de montrer que des concentrations de soude inférieures à 0,5% n'ont peu ou pas d'effet dans l'élimination des biofilms bactériens. En revanche pour 1% en soude avec action mécanique le taux de réduction décimale devient très important avec près de 6 u.log.

Concernant la deuxième phase de décrochement des biofilms à *Pseudomonas fluorescens*, nous avons pu montrer que l'arrachement est aussi fonction de la gamme de contraintes en paroi testée et de la concentration en soude. Nous avons montré que $K_{\max 2}$ variait de façon exponentielle avec la contrainte moyenne en paroi (nous nous sommes

situés systématiquement en régime d'écoulement turbulent). L'action chimique et la combinaison action chimique et mécanique permet d'augmenter la constante de vitesse K_{max2} tout en restant dans des proportions modestes par rapport à K_{max1} (de 1/100 à 1/10). Nous rappelons que le niveau de détection minimal au travers des techniques variées que nous avons utilisées est de quelques bactéries par cm^2 . Ainsi même dans le cas le plus favorable (action mécanique et soude à 1%) nous ne pouvons assurer une élimination complète du biofilm de la surface.

La deuxième étude a porté sur les cinétiques d'élimination des biofilms de *Bacillus* complété par des essais sur biofilms mixtes *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus*. Cette étude a permis de montrer qu'au cours de la formation des biofilms, les cellules du biofilm commencent à sporuler à partir de la douzième heure après adhésion.

Aussi, nous avons pu :

- 1) constater que le pourcentage de spores variait considérablement avec la souche bactérienne et pouvait également différer de façon significative pour une même souche.
- 2) confirmer des observations antérieures à savoir que les biofilms de certaines souche de *Bacillus* lors de leur formation ne produisaient pas ou peu de matériel exo-polysaccharidique (Simoes, *et al.*, 2007).
- 3) proposer le même modèle de cinétique de nettoyage que pour *Pseudomonas fluorescens* avec 2 cinétiques d'ordre 1 correspondant à 2 sous-populations au sein du biofilm. La forme des évolutions cinétiques diffère des cinétiques d'élimination du biofilm à *Pseudomonas* avec pour K_{max2} des valeurs très faibles voire proches de zéro. Cela se traduit dès le début de la deuxième phase de la cinétique par une population résiduelle constante.
- 4) montrer que les cinétiques d'élimination de la partie sporulée sont proches de celles traduisant l'élimination du biofilm total. La concentration en spores dans le biofilm résiduel peut être relativement élevée (>50%) comme c'est le cas pour les deux souches issues de sites agro-industriels. Les spores n'étant pas systématiquement en contact avec la paroi et a priori plutôt moins que les cellules végétatives d'après nos résultats sont éliminées comme le biofilm, la première phase correspondant à l'élimination des structures tridimensionnelles et d'une partie des cellules directement en contact avec la paroi.
- 5) montrer qu'en condition de biofilms mixtes, *Bacillus cereus* 98/4 sporule de la même manière (80% de spores dans le biofilm initial) et apparaît aussi résistante qu'en situation de biofilm mono espèce. Cette résistance, est également observée sur la partie *Pseudomonas fluorescens* voire semble plus importante.

La troisième étude portait sur le phénomène de réadhesion qui a lieu lors du nettoyage des installations en agro-industrie. Nous avons choisi de travailler avec des spores de *Bacillus* pour faire suite à l'étude des biofilms à *Bacillus* contenant une fraction non négligeable de spores. Cette étude nous a permis de démontrer que les bactéries qui se décrochent se déposent en aval et que ce dépôt est fortement lié à la géométrie des systèmes concernés et donc à l'organisation des écoulements (cas particulier par exemple d'une vanne de séparation de circuits).

Les perspectives à ce type de travaux sont relativement nombreuses, en effet les champs d'investigation offerts par ce domaine du génie de l'hygiène est particulièrement vaste. Les choix sont aussi dépendant du poids mis dans l'activité relevant de telle ou telle discipline de ce domaine par définition très pluridisciplinaire (microbiologie, bactériologie, génie des procédés incluant la mécanique des fluides, la cinétique chimique, la dynamique aux interfaces entre les dépôts microbiens et les supports abiotiques...).

Nous pouvons classer ces perspectives suivant qu'elles relèvent de questions de science ou de finalités industrielles.

Questions de science :

- 1) La poursuite des activités sur un ou plusieurs biofilms modèles afin d'élucider les mécanismes mis en œuvre dans les toutes premières minutes du décrochement qui semble une étape majeure comme nous l'avons observé avec les biofilm à *Bacillus cereus* ou avec les biofilms mixtes. Nous disposons d'outils de visualisation au laboratoire à l'aide d'outil de microfluidique.
- 2) L'activité sur les cinétiques d'élimination des biofilms mixtes en est à son tout début et mériterait d'être poursuivie. En effet comme l'ont montré d'autres auteurs, l'implantation et la résistance aux opérations d'hygiène de pathogènes est favorisé par une flore connexe ou préalable dont fait partie *Pseudomonas*. Quelles sont les propriétés spécifiques de ces biofilms favorisant leurs résistances et quelles sont les conséquences en termes de cinétiques d'élimination?
- 3) L'implantation de biofilms résistants ne se fait pas uniquement au cours d'un seul cycle de production et de nettoyage. Des études récentes notamment de Carpentier *et al.* (2009) ???? ont montré l'augmentation au cours des cycles de contamination et de nettoyage des surfaces une augmentation non pas de la flore viable et cultivable mais de la flore viable mais non cultivable. Quand est-il des cinétiques d'élimination de cette fraction du biofilm ?

Application industrielle :

- 1) Au vu des résultats de nos expériences, il serait intéressant d'envisager pour le nettoyage des lignes de transformation l'installation d'un système de nettoyage avant et après des équipements tels que les pasteurisateurs.
- 2) A partir de la modélisation des cinétiques proposées, et de la connaissance des zones à risques (points critiques) de proposer des conditions de nettoyage assurant une contamination résiduelle connue et ainsi mieux cibler les conditions de la désinfection étape pouvant être critique en termes d'impact sur l'environnement.
- 3) La conception hygiénique dépend aussi des risques auxquels considérés. Les approches expérimentales de validation existent avec mise en œuvre de contaminations avec des cellules isolées. Le lien direct entre zones où la contamination reste et le risque biofilm est fait naturellement. Il n'est cependant pas évident que toutes ces zones conduisent à la formation de biofilms vrais. Quels sont les conditions de surfaces des matériaux, de l'organisation des écoulements donc de géométries qui favorisent ou non le développement de biofilms vrais. La question corolaire est la suivante : où est-ce que le biofilm formé devient critique au regard des opérations d'hygiène qu'il est raisonnable de mener.
- 4) La chimie du nettoyage semble avoir ici une très grande importance, on peut effectivement pour faire simple proposer d'augmenter la concentration en soude et les températures. Cela se révélerait efficace sur nos biofilms modèles, ce n'est probablement pas le cas sur des biofilms mixtes construits au travers de séries de cycles d'hygiène cependant. En revanche, l'impact sur l'environnement est mauvais et ne va pas dans le sens des exigences actuelles imposées progressivement aux industries agro-alimentaires. Il serait très important d'explorer des techniques alternatives permettant soit de limiter le détergent, soit proposer des détergents « bio » type enzymatiques, ou encore le couplage avec des techniques physiques (favorisant l'action mécanique tels les débits pulsés, les systèmes à microbulles...) et cela nous renvoie aux questions de science à traiter : quelles mécanismes d'arrachement pour quelles structures.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albert, I., et P. Mafart. 2005.** A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 100: 197-211.
- Alison, D. G (2003).** The biofilm matrix. *Biofouling*, 19, 139-140
- Allison, D.A., and Sutherland, I.W. (1987)** The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133,1319-1327
- Andersson, A., & Rönner, U. (1998).** Adhesion and removal of dormant, heat-activated, and germinated spores of three strains of *Bacillus cereus*. *Biofouling*, 13, 51-67.
- Anwar, H., Dasgupta, M., Costerton, J.W. (1990).** Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2043–2046.
- Anwar, H., Strap, J.L., Costerton, J.W. (1992).** Eradicating of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin. *Can. J. Microbiol.* 38, 618–625.
- Asther, M., Bellon-Fontaine, M.N., Capdevila, C. et Corrieu, G., (1990),** A thermodynamic model to predict phanerochaete chrysosporium INA-12 to various solid carriers in relation to lignin peroxydase. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 477 – 482.
- Azeredo, J., Visser & Oliveira, R. (1999).** Exopolymer in bacterial adhesion : interpretation in terms of DLVO en xDVLO theories. *Colloides surf B: Biointerfaces* 14, 141-148.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003).** The microbial ecology of processing equipment in different fish industries e analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 239-250.
- Bakke, R., Trulear, M.G., Robinson, J.A., Characklis, W.G. (1984).** Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: steady state. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1418–1424.
- Bakker, D.P., Huijs, F.M., de Vries, J., Klijnstra, J.W., Busscher, H.J. et van der Mei, H.C., (2003),** Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Colloids Surf.*, B 32, 179 – 19
- Belmar-Beiny M T and Fryer P J (1993)** Preliminary stages of fouling from whey protein solutions. *Journal of Dairy Research* 60 467–483.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H. H. M., Altendorf, K., & Zehnder, A. J. B. (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(11),

3973-3977.

Bénézech, T., Lelièvre, C., Membré, J.M., Viet, A.F., & Faille, C. (2002). A new test method for in-place cleanability of food processing equipment. *Journal of Food Engineering*, 54, 7-15.

Berg, J.D., Matin, A., Roberts, P.V. (1982). Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 814–818.

biofilm systems. In W. G. Characklis, & K. C. Marshall (Eds.), *Biofilms* (pp. 341 e394). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Bird M R and Bartlett M. (1995). CIP optimisation for the food industry: relationships between detergent concentration, temperature and cleaning time. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers* 73 63–70.

Bird M R and Fryer P J. (1991). An experimental study of the cleaning of surfaces fouled by whey proteins. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers* 69 13–21

Blanpain-Avet *et al.* sous presse

Blanpain-Avet P., C. Faille, G. Delaplace, T. Bénézech. ; (2011) Cell adhesion and related fouling mechanism on a tubular ceramic microfiltration membrane using *Bacillus cereus* spores. *Journal of Membrane Science*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 4 October 2011

Blel, W. Bénézech, T., Legentilhomme, P., Legrand, J., & Le Gentil-Lelièvre, C. (2007). Effect of flow arrangement on the removal of *Bacillus* spores from stainless steel equipment surfaces during a Cleaning In Place procedure. *Chemical Engineering Science*, 62, 3798-3808.

Blel, W. Legentilhomme, P., Legrand, J., Bénézech, T., & Le Gentil-Lelièvre, C. (2008). Hygienic design: effect of hydrodynamics on the cleanability of a food processing line. *AIChE Journal*, 54, 2553-2566.

Block, J.C. (1992). Biofilms in drinking water distribution systems. In: Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), *Biofilms-Science and Technology*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 469–485.

Booth, I. R. 2002. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology* 78: 19-30.

Bos, R., Van der Mei, H. C., Gold, J., & Busscher, H. J. (2000). Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letter*, 189(2), 311-315.

Bournes M.C., Jennings W.G. (1963). Existence of two soil species in detergency investigations. *Nature*, 197:1003-1004.

Branda, Steven S. Åshild Vik, Lisa Friedman, Roberto Kolter. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20-26

Breand, S. 1998. Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH, pp. 266. Université Claude Bernard, Lyon, France.

Bredholt, S., J. Maukonen, K. Kujanpaa, T. Alanko, U. Olofson, U. Husmark, A. M. Sjoberg, and G. Wirtanen. 1999. Microbial methods for assessment of clearing and disinfection of food-processing surfaces cleaned in a low pressure system. *Eur. Food Res. Technol.* 209:145-152.

Brehm-Stecher, B. F., et E. A. Johnson. 2004. Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 538-559.

Breyers, J. D., & Ratner, J. P. (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News*, 70, 232–237.

Brigitte Carpentier , Nesrine Marouani-Gadri, Gladys Augier. (2009). Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7 *International Journal of Food Microbiology*, 133, 1-2; 62-67

Brown, M.R.W., Allison, D.G., Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: A growth-rate related effect. *J. Antimicrob. Chemother.* 22, 777–780.

Brugnoni, L.I., Lozano, J.E. & Cubitto, M.A. (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40, 332–340.

Buchanan, R. L., M. H. Golden, et R. C. Whiting. 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection* 56: 474-478.

Burfoot, D, K.E. Middleton, J.T. Holah. (2009) Removal of biofilms and stubborn soil by pressure washing *Trends in Food Science and Technology*, 20, S45-S47

Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lawrence, J.R. (1992). Confocal laser microscopy and computer image analysis in microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* 12, 1–67.

Caroline Le Gentil, Yahaya Sylla, Christine Faille.(2010). Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of Food Engineering*, 96, 37-42

Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores, a review. *Journal of Applied Bacteriology* 42: 1-19.

Characklis & Wilderer, 1989. Structure and function of biofilms. Wiley, Chichester, pp 369-371.

Characklis William G; Hector A. Videla. (1992), Biofouling and microbially influenced corrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 29, 3-4, 195-212

Characklis, W.G. and Cooksey, K.E. (1983) Biofilms and microbial fouling. *Adv. Appl. Microbiol.* **29**, 93-137

Chen, J., Rossman, M. L., & Pawar, D. M. (2007). Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. *LWT – Food Science and Biofilms-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 529–549

Cheryan, Munir Mohamed A. Mehaia (1986). Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor *Enzyme and Microbial Technology*, 8; 5, 289-292,

Chmielewski, R.A.N. & Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 22–32.

Christian G K (2004) Cleaning of carbohydrate and dairy deposits. PhD thesis, University of Birmingham, UK.

Chung, K., Dickson, J.S. and Croule, J.D. (1989) Attachment and proliferation of bacteria on meat. *J. Food Prot.* **52**, 173-177

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., deBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994a. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142.

Costerton, J.W., Marrie, T.J. & Cheng, K.-J. (1985). Phenomena of bacterial adhesion. In: *Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance* (edited by D. Savage & M. Fletcher). pp. 3–43. New York: Plenum Press.

Couvert, O., I. Leguerinel, et P. Mafart. 1999. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 49: 57-62.

Daniel. R., Vanderleyden, J., & Michels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 261-289.

Dankert, J., Hogt, A.H. and Feigen, J. (1986) Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization and identification. *Crit. Rev. Biocompat.* 2, 219-301

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. & Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm.

Science, 280, 295–298.

Debeer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z., 1997. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 151–158.

Decho, A. W. (1999). Chemical communication within microbial biofilms: chemotaxis and quorum sensing in bacterial cells. In J. Wingender, T. R. Neu, & H.-C. Flemming (Eds.), *Microbial bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity*. FEMS Microbiology Letter, 189(2), 311-315.

Delplace, F., Leuliet, J.C. (1995). "Modelling fouling of a plate heat exchangers with different flow arrangements by whey proteins solutions." *Trans IchemE part C*. **73**: 112-120.

Derjaguin, B.V. et Landau, L., (1941), Theory of the stability of strongly charged hydrophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim.*, URSS 14, 633 – 662.

Dewanti, R., & Wong, A. C. L. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O1 57:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 147-164.

Dexter, S.C., (1979), influence of substratum critical surface tension on bacteria adhesion – in situ studies. *J. Colloid Interface Sci.*, 70, 346 – 354.

DIN (1992). *Milshwirtschaftliche Maschinen. Tanks und Apparate. Oberflächen (Dairy Machines, Tanks and Apparatus Surfaces)*. Deutsche Norm DIN 11 480. Berlin, Deutsches Institute für Normung e.V., Normenausschuss Maschinenbau.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease*, 8(9), 881-890.

Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.

Doyle, R.J., Nedjat-Haiem, F., Singh, J.S., 1984. Hydrophobic characteristics of *Bacillus spores*. *Curr. Microbiol.* 10, 329-332.

Drenkard, E., & Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416, 740–743.

Duguid, J. P., Anderson, E. S., & Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 92(1), 107-138.

Dunsmore, D.G., Twomey, A., Whittlestone, W.G. and Morgan, H.W. (1981) Design and performance of systems for cleaning product contact surfaces of food equipment: a review. *Journal of Food Protection* **44**, 220–240.

Dürr H. (2002). Milk Heat Exchanger Cleaning: Modelling of Deposit Removal II *Food and Bioproducts Processing*, 80, 253-259

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 20, 2444–2449.

Eginton, P.J., Holah, J., Allison, D.G., Handley, P., Gilbert, P., 1998. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleaning agents. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 101–105.

Eneroth, A., Christiansson, A., Brendehaug, J. & Molin, G. (1998). Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal*, 8, 829–834.

European Hygienic Equipment Design Group 1993a. Hygienic design of closed equipment for the processing of liquid food. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 375–379.

Evans, D.J., Allison, D.G., Brown, M.R., Gilbert, P., 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: Effect of specific growth rate. *J. Antimicrob. Chemother.* 27, 177–184.

Faille, C. Tauveron, G., Le Gentil-Lelièvre, C. & Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection*, 70, 2346-2353.

Faille, C., DENNIN, L., Bellon-Fontaine, M.N., Bénézech, T. 1999. Cleanability of stainless steel surfaces soiled by *Bacillus thuringiensis* spores under various flow conditions. *Biofouling*. 14 (2), 143-151.

Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., & Bénézech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 728-738.

Faille, C., Tauveron, G., Gentil-Lelievre, L.C. & Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection*, 70, 2346–2353.

Faille, Y. Sylla, C. Le Gentil, T. Bénézech, C. Slomianny, Y. Lequette. (2010). Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment *Food Microbiology*, 27, 769-776.

Farber, B.F., Kaplan, M.H., Clogston, A.G., 1990. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J. Infect. Dis.* 161, 37–40.

- FDA, USDA, USEPA & CDCP** (1997). Food Safety from Farm to Table: a national food safety initiative. Report to the President. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fsreport.html>
- Fernandez, A., C. Salmeron, P. S. Fernandez, et A. Martinez.** 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology* 10: 158-162.
- Fernandez, A., J. Collado, L. M. Cunha, M. J. Ocio, et A. Martinez.** 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology* 77: 147-153.
- Flemming, H.C., Geesey, G.G.,** 1991. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
- Fletcher, M.,** (1991), The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 32, 53 – 85.
- Flint, S.H. & Brooks, J.D. (2001). Rapid detection of *Bacillus stearothermophilus* using impedance-splitting. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 205–208.
- Flint, S.H.** (1998). Formation and control of biofilms of thermo-resistant streptococci on stainless steel. Department of Food Technology. Palmerston North, Massey University.
- Flint, S.H., Bremer, P.J. & Brooks, J.D.** (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant. Description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11, 81-97.
- Flint, S.H., Brooks, J.D. & Bremer, P.J.** (1997b). The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 508–517.
- Flint, S.H., Brooks, J.D. & Bremer, P.J.** (2000). Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43, 235–242.
- Frank, J. & Koffi, R.A.** (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53, 550–554.
- Frank, J. F., Ehlers, J., & Wicker, L.** (2003). Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. *Food Protection Trends*, 23, 654–663.
- Fryer P J and Bird M R** (1994) Factors which affect the kinetics of cleaning dairy soils. *Food Science and Technology Today* 8 36–42.

Fryer P J, Hasting A P M and Jeurnink T J M (eds) (1996) *EUR 16894 -Fouling and Cleaning in Food Processing*, pp 248. Luxembourg: Office for Official Publication of the EC, 1996.

Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 3, 685–695.

Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR–LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annual Reviews in Microbiology*, 50, 727–751.

Geeraerd, A. H., C. H. Herremans, et J. F. V. Impe. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59: 185-209.

Geeraerd, A. H., V. P. Valdramidis, et J. F. Van Impe. 2005. GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102: 95-105.

Geesey, G.G., 1982. Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *Am. Soc. Microbiol. News* 48, 9–14.

Georgiadis MC, Rostein G E and Macchietto S (1998) Optimal design and operation of heat exchangers under milk fouling. *American Institute Chemical Engineers, Journal* 44 2099–2111.

Gibbons, R.J. and Van Houte, J. (1980) Bacterial adherence and the formation of dental plaques. In: *Bacterial Adherence* (Ed. E. Beachey) Chapman & Hall, New York, pp. 61-104

Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., Holah, J.T., 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 87, 41–48.

Gilbert, P., Collier, P.J., Brown, M.R.W., 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1865–1886.

Glover, F.A., 1985. Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry. National Institute for Research in Dairy, Reading, England, UK.

Golomb, A., Besik, F., 1970. Reverse osmosis—a review of its application to waste treatment. *Water Sewage Works* 117, R81–R89.

Grasshoff A (1989) Environmental impact of the use of alkaline cleaning solutions. In *Fouling and Cleaning in Food Processing*, pp 107–114. Kessler H G and Lund D B, eds. University of Munich, Germany.

Grasshoff A (1997) Cleaning of heat treatment equipment. *IDF Monograph, Fouling and cleaning in*

Heat Exchangers, International Dairy Federation, Brussels

Grijnspeerd K, Mortier L, de Block J and van Renterghem R (2004) Applications of modelling to optimize ultra high temperature milk heat exchangers with respect to fouling. *Food Control* **15** 117–130

Gunduz, G. T., & Tuncel, G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3e4), 329-336.

Guobjornsdottir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. (2005). Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gram negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 55-61.

Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 228–233.

Hamza, A., Pham, V.A., Matsuura, T. et Santerre, J.P. (1997), Development of membranes with low surface energy to reduce the fouling in ultrafiltration applications. *J. Memb. Sci.*, 131, 217-27.

Harbron, R. S., & Kent, C. A. (1988). Aspects of cell adhesion. In L. F. Melo, T. R. Bott, & C. A. Bernardo (Eds.), NATOASI series, Vol. 145 (pp. 125–140).

Heinzel, M. (1998). Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 225–234.

Herald, P.J., Zottola, E.A., 1988a. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. *J. Food Prot.* 51, 445–448.

Herald, P.J., Zottola, E.A., 1988b. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. Food Prot.* 53, 1549–1552, 1562.

Herrera, J.J.R., Cabo, M.L., Gonzalez, A., Pazos, I., & Pastoriza, L. (2007). Adhesion and detachment kinetics of several strains of strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology*, 24, 585-591

Hodgson, A.E., Nelson, S.M., Brown, M.R.W., Gilbert, P., 1995. A simple in vitro model for growth control of bacterial biofilms. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 87–93.

Holah, J. T., and R. H. Thome. 1990. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *J. Appl. Bacteriol.* 69:599-608.

Holah, J.T., Betts, R.P., Thorpe, R.H., 1988. The use of direct epifluorescent microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter technique (DEFT) to assess microbial populations on

food contact surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 215–221.

Holah, J.T., Betts, R.P., Thorpe, R.H., 1989. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene. *International Biodeterioration* 25, 147–153.

Hoyle, B. D., J. Jass, and J. W. Costerton. 1990. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J. Antimicrob. Chemother.* 26:1-6.

Hoyle, B.D., Alcantara, J., Costerton, J.W., 1992. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2054–2056.

Huang, C.T., Yu, F.P., McFeters, G.A., Stewart, P.S., 1995. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2252–2256.

Hüsmark, U., Bénézech, T., Faille, C., & Rönner, U. (1999). *Bacillus* spores and moulding TTC AGAR: a useful method for the assessment of food processing equipment cleanability. *Biofouling*, 14, 15-24.

INVS 07/08/09: Institut National de Veille Sanitaire : Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives en France en 2008.

Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163–173.

Jennings W G, McKillop A A and Luick J R (1957) Circulation cleaning. *Journal of Dairy Science* 40 1471–1479.

Jensen, A., Larsen, M. H., Ingmer, H., Vogel, B. F., & Gram, L. (2007). Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Food Protection*, 70(3), 592-599.

Jensen, B.B.B., Friis, A., Bénézech, T. Legentilhomme, P. & Lelièvre, C. (2005). Local wall shear stress variations predicted by computational fluid dynamics for hygienic design. *Trans IChemE part C Food and Bioproducts Processing*, 83, 53-60.

Jensen, B.B.B., Stenby, M., & Nielsen, D.R. (2007). Improving cleaning effect by cleaning average velocity. *Trends in Food Science & Technology*, 18, S52-S63.

Jessen, B., & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 265–269.

Jeurnink Th J M and Brinkman D W (1994) The cleaning of heat exchangers and evaporators after processing milk or whey. *International Dairy Journal* 4 347–368.

Jonsson, A.S. et Jonsson, B. (1991), The influence of non-ionic and ionic surfactants on hydrophobic and hydrophilic ultrafiltration membranes. *J. Memb. Sci.*, 56, 49 – 76.

- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Lebret, V., & Faille, C.** (2003). Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56, 77-87.
- Kirtley, S.A. & McGuire, J.** (1989). On differences in surface constitution of dairy product contact materials. *Journal of Dairy Science*, 72, 1748–1753.
- Koopal, L.K.** (1985) Physicochemical aspects of hard surface cleaning 1. Soil removal mechanisms. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 39, 127–154.
- Krysinski, E. P., L. J. Brown, and T. J. Marchisello.** 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J. Food Prot.* 55:246–251.
- Kuusela, P., Moran, A. P., Vartio, T., & Kosunen, T. U.** (1989). Inter-action of *Campylobacter jejuni* with extracellular matrix components. *Biochimica et Biophysica Acta*, 993(2-3), 297-300.
- Ladd, T.L., Costerton, T.W.,** 1990. Methods for studying biofilm bacteria. *Methods Microbiol.* 22, 285–307.
- Langeveld, L.P.M., Van Montfort-Quasig, R.M.G.E., Weerkamp, A.H., Waalewijn, R. & Wever, J.S.** (1995). Adherence, growth and release of bacteria in a tube heat exchanger for milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49, 207–220.
- Langsrud, S., Sidhu, M. A., Heir, E., & Holck, A. L.** (2003). Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 283–290.
- LeChevalier, M.W., Babcock, T.M. and Lee, R.G.** (1987) Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2714-2724
- Lee, S. and Frank, J.F.** (1991) Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *J. Food Prot.* 54, 4-6
- Lelieveld H L M (ed.)** (2003) *Hygiene in Food Processing*. Cambridge: Woodhead.
- Lelieveld H L M, Mostert M A and Holah J** (eds) (2005) *Handbook of hygiene control in the food industry*. Cambridge: Woodhead.
- Lelièvre, C., Antonini, G., Faille, C., & Bénézech, T.** (2002a). Cleaning In Place – Modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by *Bacillus* spores assuming a process combining removal and deposition. *Trans IChemE part C Food and Bioproducts Processing*, 80, 305-311.
- Lelièvre, C., Legentilhomme, P., Gaucher, C., Legrand, J., Faille, C., & Bénézech, T.** (2002b). Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. *Chemical Engineering Science*, 57, 1287-1297.

- Lequette Yannick, Christine Faille, Annette Ronse, Christian Slomianny, Estelle Garénaux, Yann Guerardel.** (2010). Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 125-135
- Leriche, V., Carpentier, B.,** 1995. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single-and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. *J. Food Prot.* 58, 1186–1191.
- Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R., Scheetz, R.,** 1991. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *J. Ind. Microbiol.* 8, 213–222.
- Liu, Y. et Zhao, Q.** (2005), Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophysical Chemistry*, 117, 39 – 45.
- M. Fletcher,** (1996) Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In: *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, edited by M. Fletcher (Wiley-Liss, New York), p. 1.
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, et I. Leguerinel.** 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72: 107-113.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Hagny, P.,** 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53, 742–746.
- Mah, T.-F., & O'Toole, G. A.** (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 34–39
- Marouani-Gadri Nesrine, Olivier Firmesse, Danielle Chassaing, Dennis Sandris-Nielsen, Nils Arneborg, Brigitte Carpentier.** (2010). Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment *International Journal of Food Microbiology*, 144, 96-103
- Mattila-Sandholm, T. and Wirtanen, G.** (1992) Biofilm formation in the food industry: a review. *Food Reviews International* 8, 573– 603.
- Maukonen, J., Mattö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M.** (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 327–356.
- McEldowney, S. and Fletcher, M.** (1986) Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appt. Environ. Microbiol.* 52, 460-465.
- McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H., Stewart, P.S.,** 1995. Physiological methods to study

biofilm disinfection. *J. Ind. Microbiol.* 15, 333–338.

McMeekin, T. A., J. Olley, D. A. Ratkowsky, et T. Ross. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 73: 95-407.

Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., 1992. Biofilms: Science and Technology. In: NATO ASI Series E, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

Membre, J. M., V. Majchrzac, et I. Jolly. 1997b. Effects of temperature, pH, glucose and citric acid on the inactivation of *Salmonella typhimurium* in reduced caloriemayonnaise. *Journal of Food Protection* 60: 1497-1501.

Midelet, G., Kobilinsky, A., Carpentier, B., 2006. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2313–2321.

Midelet, G., Kobilinsky, A., Carpentier, B., 2006. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2313–2321.

Møretro, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K., Langsrud, S., 2003. Biofilm formation and the presence of the intracellular adhesion locus *ica* among Staphylococci from food and food processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5648–5655.

Morton, L. H. G., Greenway, D. L. A., Gaylarde, C. C., & Surman, S. B. (1998). Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 247–259.

Morton, L.H.G. & Gaylarde, C.C. (2001). The role of microbial slimes in biodeterioration. *Culture*, 22, 1-4.

Mosteller, T.M. & Bishop, J.R. (1993). Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection*, 56, 34–41.

Murphy, P.M., Lynch, D. & Kelly, P.M. (1999). Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52, 45–50.

Mustapha, A., Liewen, M.B., 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quarternary ammonium sanitizers. *J. Food Prot.* 52, 306–311

Nichols, W.W. (1989). Susceptibility of biofilms to toxic compounds. In: *Structure and Function of Biofilms* (edited by W.G. Characklis & P.A. Wilderer). pp. 321–332. Chichester, UK: John

Wiley & Sons Ltd.

Notermans, S., Dormans, J.A.M.A., Mead, G.C., 1991. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. *Biofouling* 5, 1–16.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54, 49–79.

Oulahal, N., Brice, W., Martial, A., & Degraeve, P. (2008). Quantitative analysis of survival *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: propylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*, 19, 178–185.

Palmer, J., Flint, S. & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 577–588.

Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 577-588

Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13, 27–33.

Pearson, J. P., Delden, C. V., & Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of Bacteriology*, 181, 1203–1210.

Peleg, C.M. Penchina, M.B. Cole. (2001). Estimation of the survival curve of *Listeria monocytogenes* during non-isothermal heat treatments. *Food Research International*, 34, 5, 383-388.

Peng, J.S., Tsai, W.C., & Chou, C.C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 11-18.

Perni, S., Aldsworth, T.G., Jordan, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R.P., Chambel, L., Zilhao, I., Barata, B., Adriaio, A., Faleiro, L., Andrew, P., & Shama, G. (2007). The resistance to detachment of dairy strains of *Listeria monocytogenes* from stainless steel by shear stress is related to the fluid dynamic characteristics of the location of isolation. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 384-390.

Petermeier H, Benning R, Delgado A, Kulozik U, Hinrichs J and Becker T (2002) Hybrid model of the fouling process in tubular heat exchangers for the dairy industry. *Journal of Food Engineering* 55 9–17.

Petrocci, M.S., 1983. Surface-active agents: quarternary ammonium compounds. In: Block, S.S. (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA, pp. 309–329.

Plett E A (1985) Cleaning of fouled surfaces. In *Fouling and Cleaning in Food Processing*, Lund D B,

Plett E and Sandu C, eds. University of Madison, Wisconsin, USA.

Pritchard A M (1988) The economics of fouling. In *Fouling Science and Technology, NATO ASI Series, E 145*, pp 31– 45. Melo L F, Bott T R and Bernardo C, eds. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.

Ridgeway, H.F., Kelly, A., Justice, C., Olson, B.H. (1983). Microbial fouling of reverse osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: Chemical, bacteriological and ultrastructural analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1066–1084.

Ridgeway, H.F., Rigby, M.G., Argo, D.G. (1984). Adhesion of a *Mycobacterium* sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 61–67.

Ronner, U., Husmark, U., Henriksson, A., 1990. Adhesion of *Bacillus* species in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 550–556.

Röse L, Stefan H.E. Kaufmann, Sabine Daugelat. (2004). Involvement of *Mycobacterium smegmatis* undecaprenyl phosphokinase in biofilm and smegma formation. *Microbes and Infection*, 6, 965-971

Sauer, K., & Camper, A. K. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology*, 183, 6579–6589.

Schlüssler H J (1976) Zur von reinigungsvorangen an festen oberflächen brauwissenschaft. *Brauwissenschaft* 29 263–268.

Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M.R. & Flint, S.H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 109–117.

Scott, W.G., Scott, H.M., Lake, R.J. & Baker, M.G. (2000). Economic cost to New Zealand of foodborne infectious disease. *New Zealand Medical Journal*, 113, 281–284.

Sharma, M. & Anand, S.K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food† dairy processing industry – a case. *Food Control*, 13, 469–477.

Sihorkar, V., & Vyas, S. P. (2001). Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. *Pharmaceutical Research*, 18, 1254–1427.

Simmonds, P., B. L. Mossel, T. Intraphan, and H. C. Deeth. 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *J Food Prod* 66, 2070-2075

Simo es, M., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2005). Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Research*, 39, 5142–5152.

Simo es, M., Sillankorva, S., Pereira, M. O., Azeredo, J., & Vieira, M.J. (2007). The effect of

hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, 24, 249–258.

Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M.J. (2006). Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*, 84, 338–345.

Simões *et al.* (2008)

Simões, M., & Vieira, M.J. (2009). Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In *Proceedings of the international conference processes in biofilms: Fundamentals to applications* (pp. 58–62), Davis, CA, USA.

Somers, E. B., & Wong, A. C. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. *Journal of Food Protection*, 67, 2218–2229.

Srinivasan, R., Stewart, P.S., Griebe, T., Chen, C.I., Xu, X., 1995. Biofilm parameters influencing biocide efficiency. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 553–560.

Stewart, P.S., 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2517– 2522

Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D. and Lappin-Scott, H.M. (1999) Structural deformation of bacterial biofilms caused by short term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and Bioengineering* 65, 83–92.

Surette, M. G., Miller, M. B., & Bassler, B. L. (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 1639–1644.

Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3–9.

Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., & Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 254-262.

Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Langeveld, L.P.M. & Rombouts, F.M. (1997). The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy processing plants. *International Journal of Dairy Technology*, 30, 43–47

Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. & Vieira, M.J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22, 247–251.

- Timperley D A and Smeulders C N M** (1987) Cleaning of dairy HTST plate heat exchangers. Comparison of single-and two-stage procedures. *Journal of the Society of Dairy Technology* **40** 4–7.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., & Hirata, A.** (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*, 223, 287–292.
- Valdramidis V. P., Geeraerd, A. H., F. Devlieghere, H. Bernaert, J. Debevere, et J. F.
- van Boekel Martinus A.J.S.** (2002) .On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells Original *International Journal of Food Microbiology*, 74, 1-2, 25, Pages 139-159
- Van Impe. 2004.** Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology* 91: 229-244.
- van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W., Zehnder, A.J.B.,** 1990. Physical and chemical description of bacterial adhesion. *J. Biomaterial Appl.* 5, 91–106.
- Veran, J.** (2002). Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? *Food and Bioproducts Processing*, 80, 292–298.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaeer, J., Vermant, J.,** (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16, 496–506.
- Vieira, M. J., Melo, L., & Pinheiro, M. M.** (1993). Biofilm formation: hydrodynamic effects
- W. Blel, P. Legentilhomme, C. Le Gentil-Lelièvre, C. Faille, J. Legrand, T. Bénézech.** (2010). Cleanability study of complex geometries: Interaction between *B. cereus* spores and the different flow. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 40-51
- Watts, J.** (2000). More than 13 000 reported ill in Japan after drinking milk products, *Bulletin of World Health Organization*, 78, 1063-1063
- Whitehead, K.A., & Verran, J.** (2006). The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food Bioproduct Processing*, 84, 253–259.
- Whiting, R. C. 1993.** Modeling bacterial survival in unfavorable environments. *Journal of Industrial Microbiology* 12: 240-246.
- Whiting, R. C., et R. L. Buchanan. 1993.** A classification of models in predictive microbiology—a reply to K.R. Davey. *Food Microbiology* 10: 175-177.
- Widmer, A.F., Frei, R., Rajacic, Z., Zimmerli, W.,** 1990. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J. Infect. Dis.* 162, 96–102.

- Wienczek MK, Klapes AN, Foegeding PM** (1990) Hydrophobicity of Bacillus and Clostridium spores. *Appl Environ Microbiol* 56:2600–2605
- Wilson D I, Fryer P J and Hasting A P M** (eds) (2002) *Fouling, Cleaning and Disinfection in Food Processing*, p 263 Cambridge: Department of Chemical Engineering, University of Cambridge, 2002.
- Wilson D I, Fryer P J, Hasting A P M (eds)** (1999) *Fouling and Cleaning in Food Processing*, p 287 EUR 18804. Luxembourg: Office for official publications for the European Communities
- Wilson, D. I.** (2005). Challenges in cleaning: recent developments and future prospects. *Heat Transfer Engineering*, 26, 51-59.
- Wirtanen, G., Mattila-Sandholm, T.**, 1992. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 25, 50–54.
- Wirtanen, G., Mattila-Sandholm, T.**, 1993. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne bacteria grown on stainless steel surfaces. *J. Food Prot.* 56, 678–683.
- Wong, A.C.L., Cerf, O.** (1995). Biofilms: Implications for hygiene monitoring of dairy surfaces. *IDF Bull.* 302, 40–44.
- Xiong, R., G. Xie, A. E. Edmondson, et M. A. Sheard.** 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 46: 45-55.
- Zhao, Q.** (2004). Effect of surface free energy of graded NI-P-PTFE coatings on bacterial adhesion. *Surface and Coatings Technology*, 185, 199-204.
- Zobell, C.E.**, 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* 46, 39–56.
- Zottola, E.A.**, 1991. Characterization of the attachment matrix of Zottola, E.A., Sasahara, K.C., 1994. Microbial biofilms in the food *Pseudomonas fragi* attached to non-porous surfaces. Biofoul-industry—Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 37–55. 23, 125–148.
- Zottola, E.A.**, 1994. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry?. *Food Technol.* 48, 107–114

PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS



Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures

Caroline Le Gentil, Yahaya Sylla, Christine Faille *

INRA-UR638, 369 Rue Jules Guesde, BP20039, F-59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2009

Received in revised form 8 June 2009

Accepted 24 June 2009

Available online xxx

Keywords:

Cleaning in place
Detachment kinetics
Bacillus cereus spores
Re-adhesion
Process line design
Surface contamination

ABSTRACT

The possible contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place (CIP) procedures was investigated. Experiments were focused on surface contamination of straight pipes and a two-way valve, chosen as an example of complex pieces of equipment. Pipes and a two-way valve were inserted into a CIP rig, at the same time as a series of pipes highly contaminated with spores of three *Bacillus cereus* strains, with various surface properties. Following a CIP procedure, performed in conditions close to those encountered in food industries, the contamination level of the various items was estimated. A significant surface contamination occurring during CIP was evidenced, depending on the spore surface properties. Similarly to previously reported observations, when spores were suspended in optimal adhesion conditions (suspension in water at 20 °C), the re-adhesion phenomenon was controlled by the flow pattern and contamination levels inside the valve were significantly higher than in tubes. Cleaning strategies should therefore take into account the re-adhesion phenomenon to limit the risk of contamination by the process line.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The contamination of food products due to the presence of adherent bacteria in closed processing lines has become a major concern in the food industry, mainly due to their resistance to hygiene procedures (Andersson et al., 1995; Faille et al., 2001). For example, Haeghebaert et al. (2001) have suggested that equipment contamination would have been responsible for around 40% of foodborne diseases caused by bacteria in France between 1996 and 1998. Of course, a large number of studies have been carried out to improve the efficiency of cleaning in place procedures in eliminating these surface contaminations, e.g. by investigating the relative role of chemicals (Peng et al., 2002) or temperature (Wilson, 2005) and time of treatment (Lelièvre et al., 2002a). Many studies have also dealt with the properties of materials such as surface energies (Speranza et al., 2004; Hadjiev et al., 2007; Sheng et al., 2007; Zhao, 2004) and topography (Jullien et al., 2003; Whitehead and Verran, 2006) that affect cleaning efficiency. Palmer et al. (2007) also underlined the importance of plant design in controlling microbial contamination and the ease of cleaning of equipment surfaces. Indeed, hydrodynamics (design and flow conditions) is a key parameter in the understanding of cleaning (Jensen et al., 2007; Blel et al., 2007, 2008). Conversely, relatively few studies (Herrera et al., 2007; Lelièvre et al., 2002a) have reported

on the detachment kinetics of adherent bacteria. However, this approach opens the way to specific information, such as the initial detachment rate and also the level of residual contamination. Indeed, Lelièvre et al. (2002a), who studied cleaning kinetics of *Bacillus cereus* spores, reported that cleaning kinetics tend to an asymptote, or in other words, that some adherent spores were still observed on equipment surfaces, even after 30 min cleaning with a 0.5% sodium hydroxide solution at 60 °C. It was then hypothesized that, during a CIP procedure, some detached spores were able to further contaminate surfaces downstream.

Unfortunately, no particular attention was paid to this kind of contamination. However, some micro-organisms, such as the highly resistant *Bacillus* spores are able to survive most of the conditions encountered during CIP procedures such as mechanical stresses due to shear flow (Faille et al., 2007) or sodium hydroxide at high temperature (data not shown). Nevertheless, when subjected to shear stresses, the outermost membrane (exosporium) of the surviving spores was often damaged or even missing, thereby affecting the ability of spores to adhere strongly to inert surfaces.

The aim of this paper was to investigate the possible re-adhesion of *B. cereus* spores during a CIP procedure in conditions close to those encountered in food industries. Three strains characterized by different surface properties were used in order to determine whether the re-adhesion level could be affected by bacterial properties. The importance of the flow geometry on the re-adhesion phenomenon was studied through a loop arrangement

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 20 43 54 04; fax: +33 (0)3 20 43 54 26.
E-mail address: faille@lille.inra.fr (C. Faille).

consisting of tubes placed at different positions in the loop and in complex equipment, a two-way valve.

2. Materials and methods

2.1. Strains

Three strains were used in this study: the type strain *B. cereus* ATCC 14579^T, *B. cereus* CUETM 98/4, isolated from a dairy processing line and *B. cereus* 5832 isolated from the environment. Spores were obtained as previously described by Faille et al. (2007) and stored in distilled water at 4 °C before use.

2.2. Detachment kinetics

Experiments were performed with stainless steel pipes (316L, bright annealed finish) of 20 cm in length and 2.37 cm in inner diameter. Twenty pipes were soiled by *B. cereus* spores suspended in softened water, at 10^4 CFU ml⁻¹ for 1 h under static conditions, at room temperature. The 20 pipes were then drained and placed in an automated CIP pilot plant (test section in Fig. 1). The flow is fully developed in this configuration. Pipes were first rinsed with softened water at 300 l h⁻¹ (mean velocity of 0.20 m s⁻¹, Reynolds number (Re) = 4740) at room temperature for 3 min without any recirculation. To identify the initial level of contamination, four pipes were removed. The other contaminated pipes were subjected to a CIP procedure with NaOH (99% purity, Flandre Chimie, France) at 0.5% (w/w) at 60 °C and 2200 l h⁻¹ (mean velocity of 1.48 m s⁻¹, Re = 59141) with recirculation. Series of four pipes were removed after 5, 10, 15 and 30 min of CIP, and soaked in softened water to remove sodium hydroxide residues.

2.3. Re-adhesion study

In order to allow enough spores to be detached and to be candidates for further re-adhesion, higher contamination levels were re-

quired. In the following assays, eight pipes were soiled by a suspension of *B. cereus* spores in water for 1 h as described above. Four pipes were soiled with a suspension at 10^3 CFU ml⁻¹ (used to estimate the contamination level before cleaning) and the others with a suspension at 10^7 CFU ml⁻¹ (used as source of further re-contamination). Both sets of four pipes were drained and inserted into the pilot plant together with unsoiled pipes as described in Fig. 2. After a first rinsing step (300 l h⁻¹, 3 min, without any recirculation), the set of pipes soiled at 10^3 CFU ml⁻¹ was removed. The test rig was then subjected to a CIP procedure with NaOH 0.5% (w/w) at 60 °C and 2200 l h⁻¹ during 30 min with recirculation. In order to estimate the initial contamination level of these pipes, and then the maximal number of detached spores, we postulated that the contamination level was directly connected to the spore concentration in the soiling suspension. From the contamination level of the weakly soiled pipes (around $5 \cdot 10^2$ spores, whatever the strain in use), it was estimated to be close to $5 \cdot 10^6$ ($5 \cdot 10^2 \cdot 10^7 / 10^3$), whatever the strain in use.

A two-way stainless steel valve (PG 7, Pierre Guérin, France) (AISI 316L), widely used in food processing lines, was used to evaluate the re-adhesion in complex equipment (Fig. 3). This valve consisted of the upper and lower parts separated by an intermediate chamber closed by two valve disks. The upper and lower parts were only connected through an external circuit consisting of pipes and bends. The inner diameter at entries and exits was of 3.5 cm. Entries and exits of the upper and lower parts are gradual expansion or contraction (inclination of 35.9°). The length from the entry to the exit is 18 cm long. The valve was inserted into the loop between two straight pipes of 50 cm in length. The rig including the valve was subjected to the CIP procedure described above. Trials were carried out with *B. cereus* 98/4 spores. After cleaning, the valve was completely dismantled, drained and all parts to be tested were protected with aluminium foil to prevent airborne contamination.

2.4. Adhering spore detection

The residual amount of adhering spores was estimated according to the method described by Hüsmark et al. (1999). Pipes were half-filled with TTC agar and horizontally incubated for 4 h at room temperature. Before testing, the valve was dismantled to carry out the detection of the residual surface contamination and all relevant surfaces were moulded with agar (Bénézech et al., 2002) and incubated for 4 h at room temperature. Moulded agar was then gently removed from pipes and valve surfaces and incubated for further 24 h at 30 °C. *Bacillus* colonies appeared in red on the moulded surface and were easily counted.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed by general linear model procedures by means of SAS V8.0 software (SAS Institute, Cary, NC). Variance analyses were performed to determine the influence of the bacterial strain on the kinetic behaviour and to determine the influence

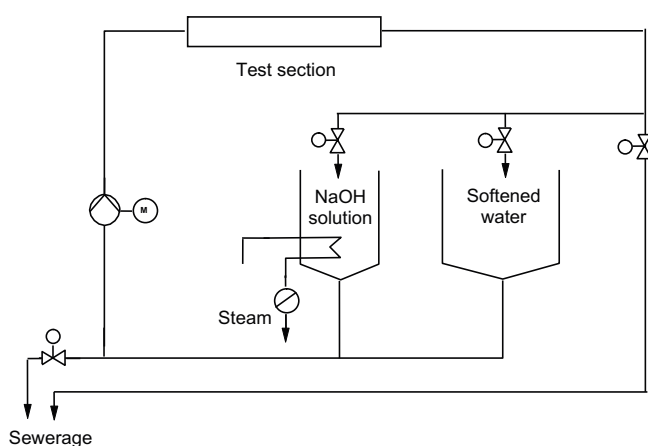


Fig. 1. Schema of the CIP pilot plant (M, volumetric pump).

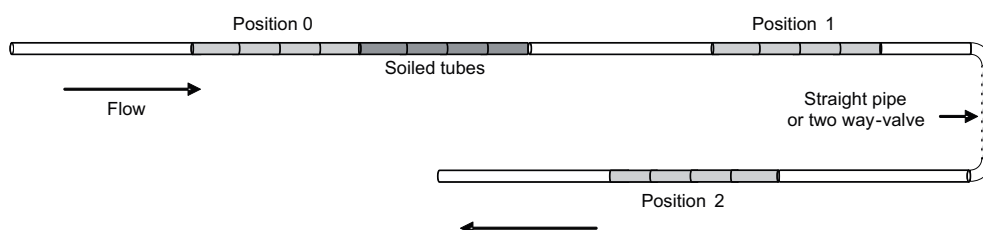


Fig. 2. Test loop for re-adhesion study in pipes.

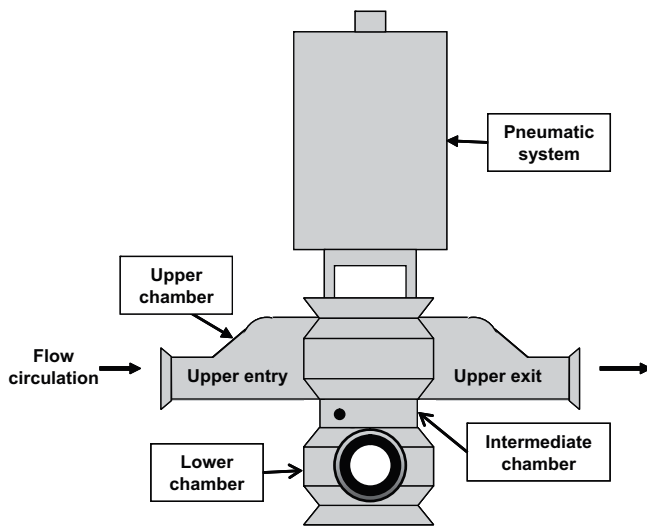


Fig. 3. Schematic diagram of the two-way valve.

of strain and position in the loop on re-adhesion. This was followed by a multiple comparison procedure by Tukey's test (α level = 0.05). A method described by Bénézech et al. (2002) was used to classify the different levels of contamination in the two-way valve using S-plus software (Seattle, USA). The clustering method (Hartigan and Wong, 1979) allows to obtain a partition of the observations within "n" groups identified according to the level of contamination, by minimising the within cluster sum of squares. Three groups of contamination levels were identified. Without assuming normal distribution, the Friedman multiple comparisons test was then performed to confirm the three groups being significantly different.

A colour was attributed to each group: in black, highly contaminated zones, in dark grey, moderately contaminated zones and light grey, slightly contaminated zones.

3. Experimental results and analysis

Bacterial adhesion occurring in any place at any time, it seems very likely that this phenomenon would also occur during CIP procedure. In this study, we investigated the possibility that some bacterial spores, detached in the course of cleaning procedures, would re-adhere downstream. The experimental conditions used in this study were close to those encountered in food industries (pilot scale), contrarily to most of the reported works which were carried out in laboratory systems such as radial (Demilly et al., 2006; Perni et al., 2007) or parallel (Guillemot et al., 2006) flow chambers.

B. cereus spores, of concern in the food industry, were chosen as the test organisms. Indeed, these bacterial spores are widespread

in nature and frequently isolated in food processing lines (Flint et al., 1997; Tauveron et al., 2006), essentially due to their ability to adhere firmly to inert materials (Faille et al., 2002; Seale et al., 2008) and to resist chemicals and heat-treatments (Faille et al., 2001; Jullien et al., 2003). Lastly, this micro-organism is a public health hazard due to their foodborne pathogenic potential. All *B. cereus* spores exhibit common properties such as a loose-fitting outermost membrane called exosporium, appendages, and a hydrophobic character. However, depending on the strain, the exosporium length and the number and length of appendages (Tauveron et al., 2006), as well as the hydrophobic character (Andersson and Rönnner, 1998) may vary greatly, and these various properties are suspected of playing a major role in spore adhesion and resistance to cleaning (Tauveron et al., 2006). We have chosen therefore to perform this study on spores from various *B. cereus* strains with different surface properties (Fig. 4): *B. cereus* 98/4, which is highly hydrophobic and surrounded by numerous appendages, *B. cereus* 5832, which has a large exosporium and few short appendages, and *B. cereus* ATCC 14579^T with intermediate properties.

3.1. Kinetics of spore detachment during CIP

We first investigated the removal kinetics of *B. cereus* spores of the three strains (Fig. 5) in order to check if adherent spores were still observed after a whole CIP procedure and to compare the level of residual spores between strains. Initially, as previously shown by Tauveron et al. (2006), the three strains exhibited quite different abilities to adhere to stainless steel. Variance analysis confirmed this observation on the initial level of adhering spores (p -value = 0.0015). The number of *B. cereus* 98/4 adherent spores is more than twice as high as for the other two strains and this observation was confirmed by the Tukey's grouping. Our results are in accordance with those of Tauveron et al. (2006) who have shown that, when adhesion occurred under static conditions, the higher the number of appendages around the spore, the higher the adhesion level. As stated above, *B. cereus* 98/4 spores were surrounded by numerous long appendages while *B. cereus* 5832 spores were surrounded by only one to three short appendages.

Fig. 5 shows a typical set of experimental data of detachment during cleaning for each strain. As expected, the amount of adherent spores first quickly decreased with time: whatever the strain, over 75% of the adherent spores were detached after a 10 min cleaning. The detachment extent was further reduced to reach between 3% and 13% of residual adherent spores after 30 min cleaning. Similar amounts of residual spores have been previously reported in tubes (2.2 cm in inner diameter) after a similar CIP procedure with higher Reynolds numbers (Reynolds numbers up to 73,200) (Lelièvre et al., 2002a). These results suggest that a significant percentage of residual contamination will withstand the cleaning procedures. Significant differences were however observed between strains (p -value = 0.0048), *B. cereus* 5832 spores

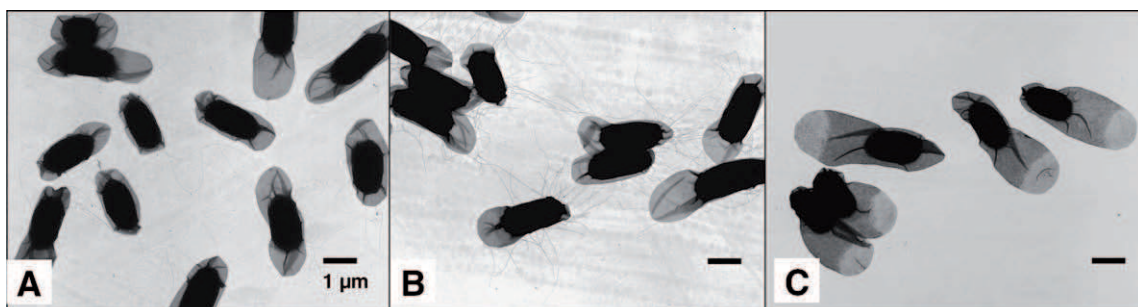


Fig. 4. Transmission electron microscopy on whole spores after negative staining. (A) *B. cereus* ATCC 14579^T, (B) *B. cereus* CUETM 98/4, (C) *B. cereus* 5832.

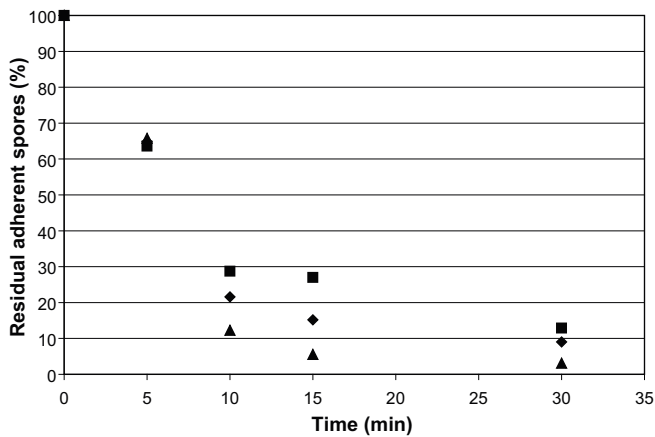


Fig. 5. Cleaning kinetics data (normalised curves), ■: *B. cereus* ATCC 14579^T ($N_0 = 6.7$), ◆: *B. cereus* CUETM 98/4 ($N_0 = 26.6$), ▲: *B. cereus* 5832 ($N_0 = 7.5$).

being the most easily detached and *B. cereus* 14579 the most resistant. From data previously obtained in our laboratory (Tauveron et al., 2006) on a panel of seven *B. cereus* strains including *B. cereus* ATCC 14579, *B. cereus* 98/4 and *B. cereus* 5832, the exosporium dimension would be of greatest importance in the resistance to cleaning, due to the effect of hydrodynamic forces. However, from these results, it is not possible to draw conclusions as to the origin of these residual spores, which might have been detached then re-adhered during the CIP procedure.

3.2. Investigation of the re-adhesion phenomenon

In order to reveal the re-adhesion phenomenon in the course of CIP, highly contaminated pipes, together with uncontaminated pipes, were inserted into the rig. The rig was then subjected to a 30 min CIP procedure (same conditions as above), and the contamination level of the initially unsoiled pipes was estimated. As shown in Fig. 6, re-adhesion occurred at all positions in the CIP flow loop, whatever the strain used. However, the re-adhesion level differed according to the bacterial strain, and the strain effect was highly significant (p -value = 0.0004). Indeed, the amount of *B. cereus* 98/4 spores contaminating the initially uncontaminated pipes was around $1.7\times$ greater than the amount of *B. cereus* 14579 spores. Despite the quite different environmental conditions between contamination assays (static vs. turbulent flow; water vs. NaOH 0.5%), *B. cereus* 98/4 spores are always among the most adherent spores.

As expected, the position in the loop also played a major role in the re-adhesion phenomenon, whatever the strain (p -value < 0.0001). Indeed, the design of equipment or process lines is known to have a great effect on the cleaning process (Blé et al., 2007, 2008) by affecting the fluid hydrodynamics. Whatever the strain, the contamination level was the lowest for pipes in position 0 and the highest for pipes in position 2. The low contamination level of the pipes in position 0 could be explained by a dilution effect. Indeed, spores adhering in position 0 (upstream from the contaminated pipes) have to flow over the whole loop including the tank (100 l) where dilution occurred. The clear difference in contamination level between areas upstream or downstream from the contaminated pipes suggests that most of the detached spores re-adhered very quickly and consequently that the areas located shortly downstream of the contaminated areas are the most susceptible to cross-contamination during the CIP procedure. Elsewhere, differences observed in the contamination level of pipes in positions 1 and 2 might reflect a different flow arrangement due to the presence of a bend placed upstream the pipes in position

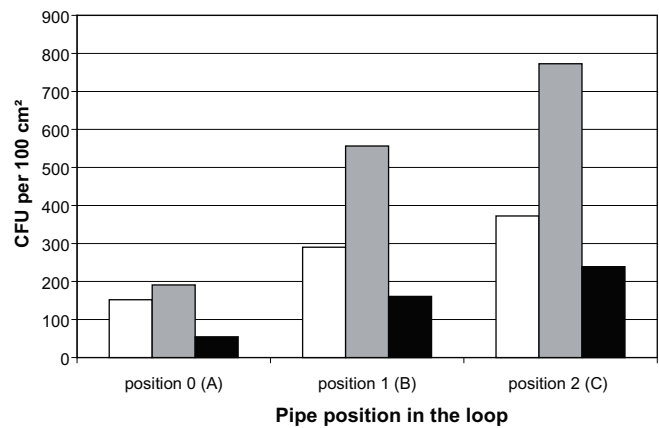


Fig. 6. Re-adhesion data in pipes (different positions in the loop). Letter into brackets indicates the result of the Tukey's grouping (groups with common letters are not significantly different), □: *B. cereus* ATCC 14579^T, ■: *B. cereus* CUETM 98/4, ■: *B. cereus* 5832.

2. Indeed, the presence of a bend on a loop has been shown to provoke flow disturbance downstream which results in strong modifications of bacterial adhesion (Blé et al., 2008). In our setting, the length of pipes upstream pipes in position 2 is not enough to ensure a fully developed flow, contrary to what happens in position 1. In position 2, flow disturbances and the induced fluctuations of wall shear stress would facilitate the access of detached spores to pipe surfaces. Conversely, for fully developed in pipes in position 1, wall shear stress fluctuations are not enough to allow a great number of spores to reach equipment surfaces.

In summary, contamination of surfaces may occur during CIP procedures, mainly on surfaces already known to be poor in terms of hygienic design in the course of food processes.

One should also bear in mind that the number of “re-adherent” spores is actually the result of two concomitant mechanisms, the adhesion and the detachment ones, both being greatly affected by flow disturbances, either high wall shear stress average values or high wall shear stress fluctuations (Blé et al., 2008). It is noteworthy that the chemical effect alone (30 min treatment with NaOH 0.5% at 60 °C under static condition) could only induce minor changes in the spore surface properties, without affecting the exosporium integrity as previously shown in our laboratory (data not shown). Conversely, exosporium could be damaged by shear stresses (Faille et al., 2007). Nevertheless, if the ability of spores subjected to a CIP to be removed from a surface is not very different from that of untreated spores, one can hypothesize from detachment kinetic results that more or less 90% of the re-adherent spores will be detached again during the CIP procedure. Consequently, one can estimate that the complete number of spores able to re-adhere in the loop (Fig. 1) including the CIP tank ($\sim 3.2 \cdot 10^4 \text{ cm}^2$ for the whole loop) would range from $1.6 \cdot 10^5$ (3%) for *B. cereus* 5832 if flow conditions were close to those encountered in position 1, to $2.4 \cdot 10^6$ (50%) for *B. cereus* 98/4 if flow conditions were close to those encountered in position 2.

3.3. Re-adhesion in a two-way valve

Previous works carried out in our laboratory have shown that bacterial contamination was promoted in complex equipment in comparison to tubes inserted in process lines, either after a single adhesion step (unpublished data) or after a CIP procedure (Lelièvre et al., 2002b; Blé et al., 2007, 2008). Similarly, Palmer et al. (2007) underlined the importance of plant design in controlling microbial contamination and ease of cleaning. In order to demonstrate that complex equipment would also promote bacterial adhesion during

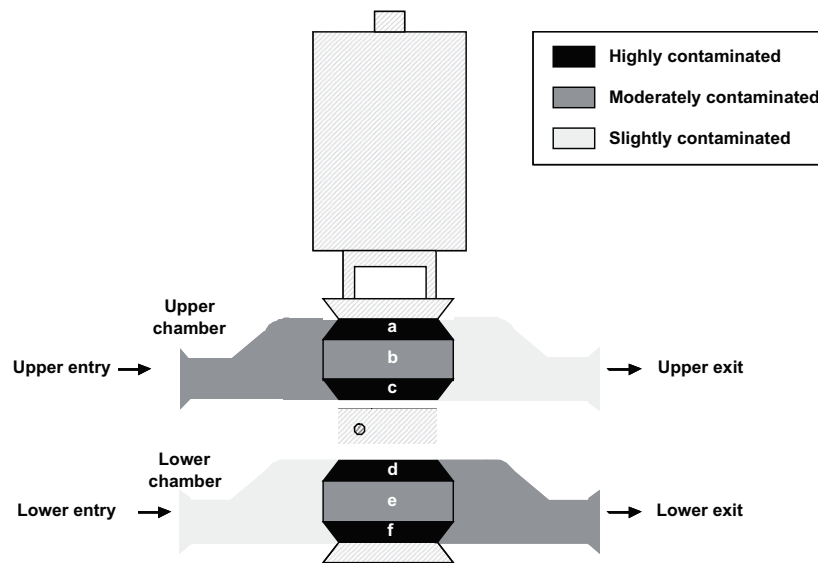


Fig. 7. Mapping of soiling levels in the two-way valve.

CIP, re-adhesion of *B. cereus* 98/4 was investigated in a two-way valve inserted in the same test loop as above. Results are shown in (Fig. 7). From the numeration results, three significantly different contamination levels have been determined: highly contaminated (black), moderately contaminated (dark grey), and slightly contaminated (light grey).

Firstly, even the less contaminated zones of the valve were significantly more contaminated than tubes (between 10 and 100 times), whatever their position along the processing line. Due to the homogeneity of material properties within the valve areas, the observed differences must depend on geometry and therefore on the shear effect of the cleaning flow in the various parts of the valve. Indeed, one might hypothesize that, due to the design, flow recirculation occurs in zones a, c, d and f, promoting high levels of spore adhesion (Blel et al., 2008). In zones b and e (valve body), the flow is suddenly slowed down, compared to the valve entry, because of the diameter increase, inducing an intermediate contamination level. Similar results have previously been reported on sudden pipe expansions (Blel et al., 2007). Contamination levels observed in entries and exits are also significant compared to tubes, due to the strong disturbances in the flow upstream, as suggested for pipes located downstream of a bend.

In summary, the valve was characterized by a high level of re-adhesion of *B. cereus* spores during CIP and could be considered as being at risk for further food contamination. Indeed, one must keep in mind the notorious food poisoning that occurred in Japan in 2000 and involved 14,000 people (Watts, 2000): this was the result of the bacterial contamination of a single valve connecting a supply pipe to a tank used to recycle left-over milk.

4. Conclusion

Cleaning procedures have to ensure the hygiene in food processing lines by the complete removal of bacteria from surfaces. It is easily conceivable that some of these detached bacteria would re-adhere downstream. In this study, we succeeded in demonstrating that *Bacillus* spores from three strains, detached from contaminated surfaces during CIP, were able to contaminate surfaces downstream. Despite great differences in the environmental conditions during food processing and during CIP procedures, the same mechanisms e.g. flow patterns seemed to underlie bacterial adhesion i.e. spores surface properties and the flow pattern. Conse-

quently, the most contaminated surfaces during CIP were found to be areas located after bends or complex equipment, all surfaces that are already known to be poorly hygienic. Consequently, the cleaning strategy must take into account the re-adhesion phenomenon occurring in disturbed zones.

Acknowledgments

This study has been financed by the “Agence Nationale de la Recherche” under the “Programme National de Recherche en Alimentation et Nutrition Humaine,” Project “ANR-05-PNRA-013, *B. cereus*” by a grant from the Région Nord-Pas de Calais (France). J.F. Migdal is thanked for his valuable assistance in the laboratory. We are also grateful to E. Dewailly, from INSERM U800, for technical assistance provided for transmission electron microscopy.

References

- Andersson, A., Rönner, U., 1998. Adhesion and removal of dormant, heat-activated, and germinated spores of three strains of *Bacillus cereus*. *Biofouling* 13, 51–67.
- Andersson, A., Rönner, U., Granum, P.E., 1995. What problems does the food industry have with spores-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* 28, 145–155.
- Bénézech, T., Lelièvre, C., Membré, J.M., Viet, A.F., Faille, C., 2002. A new test method for in-place cleanability of food processing equipment. *Journal of Food Engineering* 54, 7–15.
- Blel, W., Bénézech, T., Legentilhomme, P., Legrand, J., Le Gentil-Lelièvre, C., 2007. Effect of flow arrangement on the removal of *Bacillus cereus* spores from stainless steel equipment surfaces during a Cleaning in Place procedure. *Chemical Engineering Science* 62, 3798–3808.
- Blel, W., Legentilhomme, P., Legrand, J., Bénézech, T., Le Gentil-Lelièvre, C., 2008. Hygienic design: effect of hydrodynamics on the cleanability of a food processing line. *AIChE Journal* 54, 2553–2566.
- Demilly, M., Bréchet, Y., Bruckert, F., Boulangé, L., 2006. Kinetics of yeast detachment from controlled stainless steel surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 51, 71–79.
- Faille, C., Fontaine, F., Bénézech, T., 2001. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology* 90, 892–900.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., Bénézech, T., 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 728–738.
- Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelièvre, C., Slomianny, C., 2007. Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection* 70, 2346–2353.
- Flint, S.H., Bremer, P.J., Brooks, J.D., 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant. Description, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11, 81–97.
- Guillemot, G., Vaca-Medina, G., Martin-Yken, H., Vernhet, A., Schmitz, P., Mercier-Bonin, M., 2006. Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae*

- from stainless steel: influence of yeast and solid surfaces properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49, 126–135.
- Hadjiev, D., Dimitrov, D., Martinov, M., Sire, O., 2007. Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 840–848.
- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Vaillant, V., Delarocque Astagneau, E., Bouvet, P., 2001. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 15, 1–12.
- Hartigan, J.A., Wong, M.A., 1979. A K-means clustering algorithm. *Applied Statistics* 28, 100–108.
- Herrera, J.J.R., Cabo, M.L., Gonzalez, A., Pazos, I., Pastoriza, L., 2007. Adhesion and detachment kinetics of several strains of strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology* 24, 585–591.
- Hüsmark, U., Bénézech, T., Faille, C., Rönner, U., 1999. *Bacillus* spores and moulding TTC AGAR: a useful method for the assessment of food processing equipment cleanability. *Biofouling* 14, 15–24.
- Jensen, B.B.B., Stenby, M., Nielsen, D.R., 2007. Improving cleaning effect by cleaning average velocity. *Trends in Food Science and Technology* 18, S52–S63.
- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Lebret, V., Faille, C., 2003. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering* 56, 77–87.
- Lelièvre, C., Antonini, G., Faille, C., Bénézech, T., 2002a. Cleaning in place-modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by *Bacillus* spores assuming a process combining removal and deposition. *Food Bioproducts Processing* 80, 305–311.
- Lelièvre, C., Legentilhomme, P., Gaucher, C., Legrand, J., Faille, C., Bénézech, T., 2002b. Cleaning in place. effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. *Chemical Engineering Science* 57, 1287–1297.
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, 577–588.
- Peng, J.S., Tsai, W.C., Chou, C.C., 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology* 77, 11–18.
- Perni, S., Aldsworth, T.G., Jordan, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R.P., Chambel, L., Zilhao, I., Barata, B., Adriaio, A., Faleiro, L., Andrew, P., Shama, G., 2007. The resistance to detachment of dairy strains of *Listeria monocytogenes* from stainless steel by shear stress is related to the fluid dynamic characteristics of the location of isolation. *International Journal of Food Microbiology* 116, 384–390.
- Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J., Bremer, P.J., 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy *Bacilli* and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 731–737.
- Sheng, X.X., Ting, Y.P., Pehkonen, S.O., 2007. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. *Journal of Colloid and Interface Science* 310, 661–669.
- Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., Carli, E., Lui, A., Maniglio, D., Brugnara, M., Anderle, M., 2004. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials* 25, 2029–2037.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., Faille, C., 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology* 110, 254–262.
- Watts, J., 2000. More than 13 000 reported ill in Japan after drinking milk products. *Bulletin of World Health Organization* 78, 1063.
- Whitehead, K.A., Verran, J., 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food Bioproducts Processing* 84, 253–259.
- Wilson, D.I., 2005. Challenges in cleaning: recent developments and future prospects. *Heat Transfer Engineering* 26, 51–59.
- Zhao, Q., 2004. Effect of surface free energy of graded NI-P-PTFE coatings on bacterial adhesion. *Surface and Coatings Technology* 185, 199–204.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment

C. Faille^{a,*}, Y. Sylla^a, C. Le Gentil^a, T. Bénézech^a, C. Slomianny^b, Y. Lequette^a

^aINRA, UR638, 369 rue Jules Guesde, BP 20039, F-59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^bINSERM-LPC, U 800, Université Lille 1, Bât. SN3, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2009

Received in revised form

8 March 2010

Accepted 3 April 2010

Available online xxx

Keywords:

Bacillus spore

Exosporium

Spore injury

Cleaning-in-place

Adhesion

Viability

ABSTRACT

This study was designed to evaluate how conditions encountered by spores during cleaning-in-place (CIP) procedures affected their surface properties, their viability and ability to contaminate materials. Spores from five *Bacillus cereus* strains were treated with NaOH at high temperature. Results revealed that high temperatures (exceeding 60 °C) and NaOH concentrations (over 0.5%) were required to significantly decrease spore viability (3–5 log decrease). In these conditions, modifications were also clearly observed by microscopy to various surface structures of spores (appendages, exosporium, and especially to the hair-like nap) but also to their coat. Therefore, the ability of culturable spores to adhere decreased for the majority of strains tested. We then demonstrated that spores in suspension in NaOH could adhere to surfaces of a CIP rig and that the contamination level was controlled by flow pattern. Consequently, re-adhesion along the processing line might occur during CIP procedures and this phenomenon must be taken into account when defining cleaning strategies.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus cereus spores are of concern in food industries as these spores are highly resistant to most of the conditions encountered during food processing (Faille et al., 2001) and in the course of cleaning and disinfection procedures (Peng et al., 2002). *B. cereus* spores are frequently isolated from surfaces of food factory equipment due to their ability to firmly adhere to a wide variety of materials encountered during food processing (Faille et al., 2002).

The outermost envelope of *B. cereus* spores is a loose-fitting layer, called exosporium, whose size is noticeably larger than that of the underlying spore. As observed by transmission electron microscopy, the exosporium is composed of a basal crystalline layer and a surrounding hair-like external layer (Plomp et al., 2005; Sylvestre et al., 2003). The hair-like nap is mainly composed of a glycoprotein: BclA (Sylvestre et al., 2003). In some species, such as *B. cereus* or *Bacillus thuringiensis* (Hachisuka et al., 1984), the exosporium is surrounded by appendages of around 7 nm diameter (Plomp et al., 2005), whose number and length greatly differ among strains (Stalheim and Granum, 2001; Tauveron et al., 2006). Lastly, despite great variability in their physico-chemical properties,

B. cereus spores are generally considered to be strongly hydrophobic (Simmonds et al., 2003; Tauveron et al., 2006).

The exosporium is the outermost envelope surrounding *B. cereus* spores, directly in contact with materials. Its properties must account for the remarkably strong adhesion of *B. cereus* spores to various materials such as stainless steels or polymers. This adhesion strength has been ascribed to its exceptional hydrophobicity (Faille et al., 2002; Hüsmark and Rönnner, 1992) and also to the size of its exosporium (Tauveron et al., 2006). It is well-known that the particle size clearly influences its transport to a surface under static conditions, by affecting the sedimentation speed or the diffusion rate (Yiantsios and Karabelas, 1995). In addition, under dynamic conditions, particle size would play a major role in adhesion and detachment (Sharma et al., 1992) due to hydrodynamic forces. Furthermore, the presence of appendages would also determine adhesion capacity as hypothesized by the DLVO (Derjaguin, London, Verwey, Overbeek) theory for colloidal stability, which suggests that appendages would promote spore adhesion by facilitating spore penetration of the potential barrier (van Loosdrecht et al., 1989). However, the role of appendages in adhesion has yet to be completely explained (Klavenes et al., 2002; Stalheim and Granum, 2001). A less-examined property of these spores, their nano-scale features, such as the hair-like nap present on the external part of the exosporium may also affect their adhesion (Brahmbhatt et al., 2007).

* Corresponding author. Tel.: +33 320 435404; fax: +33 320 435426.
E-mail address: faille@lille.inra.fr (C. Faille).

Lastly, exosporia are sometimes damaged and the prevalence of spores with damaged exosporia greatly differs not only within *Bacillus* strains, but also depending on environmental conditions encountered either during sporulation or as mature spores (Faille et al., 2007). For example, shear stresses induced by circulation of a spore suspension through a loop causes exosporium injury which would affect the ability of spores to contaminate inert surfaces. One might hypothesize that the environmental conditions found during CIP, such as the presence of NaOH, high temperatures and shear stresses, might also greatly affect spore surface properties. As spores detached from surfaces of food processing lines during CIP were able to re-adhere downstream (Le Gentil et al., 2010), it is important to measure the influence of exosporium damage (caused by CIP procedures) on adhesion properties of spores.

The aim of this study was to determine the consequences of conditions encountered during CIP procedures (NaOH at high temperature) in terms of spore injury and survival rate, as well as on spore surface properties, known to play a role on spore adhesion. We completed this assessment by investigating the extent to which damaged spores were capable of adhering to stainless steel and then the behaviour of adhered spores during CIP in food processing lines (detachment vs re-adhesion).

2. Material and methods

2.1. *Bacillus* strains and spore production and treatments

Five strains belonging to the *B. cereus* species were analyzed in this study: *B. cereus* 98/4 and *B. cereus* CUETM 07/1, isolated from dairy processing lines; *B. cereus* CIP 5832, isolated from the environment; *B. cereus* ATCC 14579^T the sequenced reference strain; and *B. cereus* D6, isolated from a patient with diarrheic symptoms. Spores were prepared as previously described (Faille et al., 1999) and stored at 4 °C in sterile water until use. Before each experiment, two additional washes were performed.

Spores were subjected to treatments involving NaOH and high temperatures, supposed to mimic conditions encountered during CIP. The first treatment imitated the conditions used in our laboratory to perform experiments on spore resistance to cleaning, as this allows most of the treated spores to survive. It consists in a 30 min incubation of spores in an aqueous solution of 0.5% NaOH preheated at 60 °C. In order to determine the relative effect of temperature and NaOH, we also subjected spores to 30 min treatments either in water at 60 °C or in NaOH at 20 °C. The second treatment was that of industrial CIP conditions, consisting of a 20 min incubation of spores in a 2% NaOH aqueous solution preheated at 80 °C. After each treatment, spores were rapidly cooled, harvested by centrifugation at 4 °C and washed twice in sterile water at 4 °C. Spores were then kept at 4 °C in sterile water until use. In order to estimate the percentage of viable and culturable cells after treatments, spores were plated on nutrient agar (1.3% w/v nutrient broth (Biorad, France), 1.5% w/v bacteriological agar type E (Biokar Diagnostics, France)) and incubated for up to 5 days at 30 °C.

2.2. Microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), whole spores were adsorbed onto Formvar-coated grids (15/95, Euromedex, EMS, Hatfield, USA) and observed after negative staining with 1% uranyl acetate (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) with a Hitachi H600 electron microscope at a 75 kV accelerated voltage. In order to allow the observation of the external nap mainly composed of glycoproteins, a ruthenium red staining procedure previously described (Waller et al., 2004) and slightly modified in our

laboratory, was performed. Briefly, cells were fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M cacodylate buffer pH 7, 500 ppm ruthenium red (Sigma, St Louis, USA). After 15 min of incubation at 4 °C, cells were rinsed three times for 5 min in 0.1 M cacodylate buffer pH 7 and centrifuged at 1200 g. The pellet was resuspended in 1 mL of the post-fixative solution (2% osmium tetroxide, 0.1 M cacodylate buffer pH 7, 500 ppm ruthenium red). After a further 15 min incubation at 4 °C, the cells were rinsed three times in water for 5 min and centrifuged at 1200 g. After dehydration in graded acetonitrile, the pellets were embedded in Epon 812 (Merck, Darmstadt, Germany). Thin sections were cut on a Reichert-Jung ultramicrotome Ultracut E and collected on 100 or 150 mesh grids (H150-Cu, Euromedex, EMS, Hatfield, USA). After a double staining with 2% uranyl acetate in 50% ethanol and lead citrate (Reynolds, 1963), the sections were observed on a Hitachi 600 electron microscope at 75 kV.

2.3. Analysis of exosporium glycoprotein patterns

The presence of glycoproteins in the exosporium was investigated by electrophoresis. Before exosporium extraction, spores were washed twice in water and resuspended in PMSF (phenyl-methylsulphonyl fluoride, Sigma) 25 mM at a concentration of 10^9 spores ml⁻¹. Spore suspensions (15 mL) were subjected to three successive passages through a French press at 20,000 psi (SLM Instruments, Urbana, USA). The detached exosporia and appendages were separated from spores by two centrifugations (3000 g, 30 min, 4 °C). The supernatant was lyophilised, and boiled in a reducing buffer (125 mM Tris–HCl pH 6.8, 4% w/v SDS, 10% v/v β-mercaptoethanol, 1 mM DTT, 0.05% w/v bromophenol blue, 10% v/v glycerol) for 8 min as previously described (Steichen et al., 2003). Samples were centrifuged for 2 min at 8000 g to remove any insoluble materials. Proteins and glycoproteins were separated by SDS-PAGE (12% polyacrylamide) at 40 mA. Glycoproteins were stained with periodic acid–Schiff (PAS) stain (Sigma).

2.4. Adhesion of spores treated with NaOH at 60 °C (on stainless steel slides) or 80 °C (on silicone tubing)

304L, bright annealed stainless steel coupons (15 by 45 mm) were immersed vertically for 4 h in an aqueous suspension of spores (10^5 culturable spores ml⁻¹), which were either untreated (control) or previously treated for 20 min with 0.5% NaOH at 60 °C and rinsed in sterile water. To determine the number of adhering culturable spores, coupons were subjected to ultrasonication in 10 ml of 2% Tween 80 (v/v) (5 min, Ultrasonic bath, Deltasonic, France). The detached spores were enumerated on nutrient agar (1.3% w/v nutrient broth (Biorad, France), 1.5% w/v bacteriological agar type E (Biokar Diagnostics, France)) after 48 h of incubation at 30 °C.

In order to estimate adhesion levels of spore suspensions at low culturable spore concentrations (e.g. treated with NaOH at 80 °C), we developed a new method using silicon tubes and consisting in estimating the decrease in the number of spores in the suspension during the adhesion procedures. Silicone tubing (3 mm internal diameter and 5 mm external diameter, VWR) was thoroughly rinsed with water, dried, and cut into 1 cm long pieces. Eighty pieces were put into screw-capped vials (3 cm in diameter, 7 cm in height). Containers were then filled to 0.5 cm from the top with spore suspensions (10^2 – 5×10^3 viable spores ml⁻¹) of either untreated spores or spores treated with 2% NaOH at 80 °C. Containers were rotated for 4 h (rotator Apelab). Spore adhesion was assessed by enumerating spores in suspension before and after contact with silicone tubing on nutrient agar (1.3% w/v nutrient broth, 1.5% w/v bacteriological agar type E) after 48 h of incubation

at 30 °C. The number of adherent spores in treated batches was compared to those of untreated batches.

2.5. Spore detachment and re-adhesion to surfaces of food processing lines (pipes, valves) during CIP procedures

In order to determine the percentage of residual adherent spores after CIP, stainless steel coupons, contaminated as described above, were placed in square test pipes, connected to a CIP rig as previously described (Faille et al., 2000). The following CIP procedure was carried out: i) 5 min rinse with softened water at a mean velocity of 0.5 m s^{-1} ; ii) 10 min cleaning with 2% (v/v) Galor 7/32, an alkaline detergent (Penngar, France) at 50 °C at a mean velocity of 1.0 m s^{-1} ; iii) 5 min rinse with softened water at a mean velocity of 0.5 m s^{-1} . The rig was dismantled and the number of residual culturable spores was estimated as described above. The percentage of residual culturable spores was then calculated.

In order to investigate the possible re-adhesion of detached culturable spores during CIP, stainless steel pipes (316L, bright annealed finish) of 20 cm in length and with a 2.37 cm inner diameter and a two-way stainless steel valve (AISI 316L) were inserted into an automated CIP pilot plant (Fig. 1). These stainless steel pipes were inserted into different sites on the rig (Fig. 2), characterized by differing flow arrangements. To closely imitate the cleaning of contaminated surfaces in industrial conditions, 0.5% NaOH at 60 °C contaminated with *B. cereus* 98/4 spores ($10^4 \text{ spores ml}^{-1}$) was allowed to circulate for 12 min at 2200 l h^{-1} . After rinsing with softened water at 300 l h^{-1} , the rig was dismantled and the amount of residual culturable spores was estimated according to a method previously described (Hüsmark et al., 1999). Pipes were half-filled with TTC-agar (agar complemented with triphenyl tetrazolium chloride) and horizontally incubated for 4 h at room temperature. Moulded agar was then gently removed from pipe surfaces and incubated for a further 24 h at 30 °C. *B. cereus* colonies appearing in red on the moulded surface were counted.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by general linear model procedures using SAS V8.0 software (SAS Institute, Gary, NC, USA). Variance analyses were performed to determine the influence of treatments

(untreated vs treated with 0.5% NaOH at 60 °C, untreated vs treated with NaOH 2% at 80 °C) on spore surface properties and their ability to adhere, taking into account the variability between replicates. This was followed by a multiple comparison procedure using Tukey's test (alpha level = 0.05).

3. Results

3.1. Effect of temperature and NaOH treatments on exosporium structure

The five *B. cereus* stains used throughout this study to investigate the effects of high temperature and NaOH on exosporia were chosen for their exosporial properties. As shown by TEM on untreated spores quickly stained with uranyl acetate (Fig. 3), exosporia were undamaged under the sporulation conditions used throughout this study. Their length however, varied with strain, ranging from $2.0 \mu\text{m}$ (*B. cereus* D6) to over $3.0 \mu\text{m}$ (*B. cereus* 5832). Using ruthenium red staining and sectioning techniques to visualize the exosporium structure (Fig. 5A–C), the peripheral hair-like nap was clearly observable and appeared to have a relatively even length of around 32–35 nm, whatever the *B. cereus* strain. Some planar inclusions were observed in the perispore space of a few spores, such as those of *B. cereus* D6 (Fig. 5C).

B. cereus spores also showed appendages of about 10 nm in width anchored in the exosporium. These appendages had a spiral structure and a pitch of about 3 nm (Fig. 3B). Their number varied greatly among strains, ranging between 1 and 3 per spore (*B. cereus* 5832) and over 25 per spore (*B. cereus* 98/4). A second kind of appendage was also observed on the spores of some strains including *B. cereus* 98/4 (Fig. 3B). These appendages were thinner, with a diameter of around 3 nm and were barely visible.

When spores were treated with 0.5% NaOH at 60 °C, only slight modifications to the spore surface were observed by TEM, whatever the strain. The 10-nm appendages were still observed, but they often appeared curled (Fig. 4A). Conversely, we failed to observe any 3-nm appendages. In order to establish the respective role of temperature and NaOH, spores of *B. cereus* 98/4 and *B. cereus* ATCC 14579^T were treated with water at 60 °C or with NaOH at 20 °C (data not shown). Since observation of spores by TEM did not reveal any significant changes following treatment with hot water and

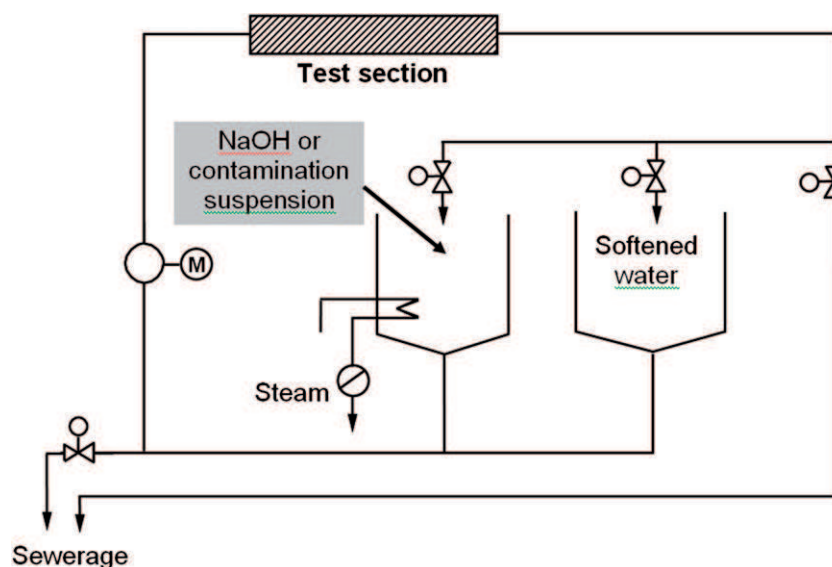


Fig. 1. CIP pilot plant plan.

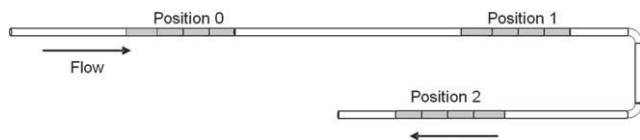


Fig. 2. Test loop for re-adhesion study in pipes.

cold NaOH, the observed modifications on the 10-nm appendages were attributed to the combined effect of NaOH and temperature.

Conversely, treatment with 2% NaOH at 80 °C provoked marked surface modifications for all strains, with a loss of almost all appendages and changes in the exosporium structure, even if most of the spores (over 90%) still exhibited a whole exosporium (Fig. 4B–F). As shown in Fig. 4, no appendages were observed on *B. cereus* 98/4 spores, but a few short appendages were still observed on *B. cereus* 07/1 and *B. cereus* D6 spores. Moreover, exosporia had a more crumpled aspect with aggregated materials at their surface. This was the case for *B. cereus* 07/1 and 98/4 spores (Fig. 4B, C). In addition, the hair-like nap had become hardly visible on spore sections, although some material remained, which was irregularly spread around the basal layer of the exosporium. Furthermore, the planar inclusions already observed in the perisporal space of some untreated spores, mainly in *B. cereus* D6 spores (Fig. 5C), were more systematically observed in the treated spores, e.g. in *B. cereus* ATCC 14579^T spores. As shown on *B. cereus* D6 (Fig. 5F, I), these inclusions presented a lamellar structure typical of the spore coat. Indeed, despite their depth, the coat layers seemed to have lost their cohesion, some being dissociated from the coat (Fig. 5D–F), even though spores were still surrounded by a whole exosporium.

3.2. Effect of temperature and NaOH treatments on electrophoretic patterns of exosporium glycoproteins

The consequences of the treatments on the chemical composition of spore surfaces were investigated. Analysis of the electrophoretic patterns of untreated spores using PAS staining, revealed

various exosporial glycoproteins (Fig. 6), including a complex of around 200–250 kDa partially composed of the major protein of the hair-like nap: BclA. Another band of high MW was also observed on the *B. cereus* 98/4 profile. Lower bands were observed between 60 and 85 kDa, depending on the strain.

Spore treatments using water at 60 °C or 0.5% NaOH at 20 °C did not clearly affect glycoprotein patterns. When temperature and NaOH were combined, PAS patterns showed a clear decrease in the intensity of the glycoprotein complex at 200–250 kDa. When 2% NaOH at 80 °C was used, all the glycoprotein bands became undetectable. Even the glycoproteins of high molecular weight, corresponding to the hair-like brush were damaged.

3.3. Effects of temperature and NaOH treatments on spore viability and injury

Spore viability was defined by the number of spores able to germinate and form colonies on nutrient agar after 5 days of incubation at 30 °C. Treatment with 0.5% NaOH at 60 °C induced only minor modifications in spore germination and growth (usually less than 50% loss in viability, data not shown). Conversely, treatment with 2% NaOH at 80 °C strongly reduced (10^3 – 10^5 -fold) the ability of spores to germinate and form colonies.

The injury of surviving spores was then estimated according to two parameters (Table 1). Firstly, the percentage of injured spores is given by the percentage of surviving spores able to form colonies after one day compared to the total number of surviving spores (after 5 days of incubation). Secondly, the severity of injuries was estimated by the time required to form colonies. Accordingly, the percentage of injured spores of *B. cereus* ATCC 14579^T and *B. cereus* D6 was assessed as being low (with respectively only 18 and 26% surviving spores unable to form colonies after a one-day incubation). In contrast spores from *B. cereus* 98/4 and *B. cereus* 07/1 exhibited high percentages of injured spores, with over 98.5% of spores failing to form colonies after a 24 h incubation. Furthermore, as shown in Table 1, the time for any surviving spores to form colonies varied between strains. Hence, *B. cereus* 5832 spores were the most deeply injured with 5 days of incubation to form colonies, whilst *B. cereus* ATCC 14579^T spores required only two days.

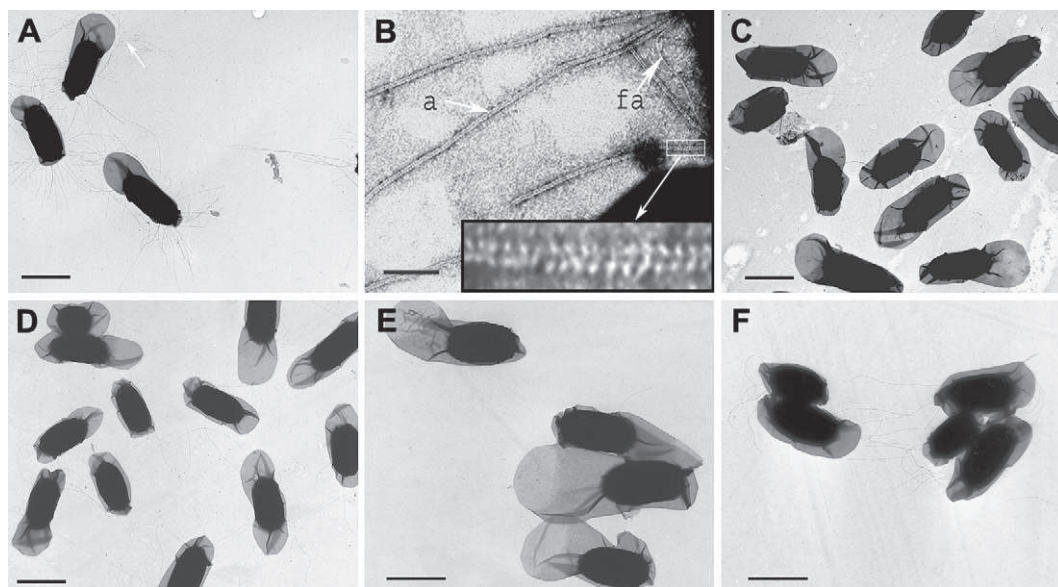


Fig. 3. Transmission electron microscopy on untreated spores after negative staining. Whole spore of *B. cereus* 98/4 with numerous appendages of 10 nm in width (white arrow) (A), *B. cereus* 07/1 (C), *B. cereus* ATCC 14579^T (D), *B. cereus* 5832 (E), *B. cereus* D6 (F). B: high-resolution image of *B. cereus* 98/4 spore with 10 nm wide appendages (a) with a spiral structure and 4 nm appendages (fa).

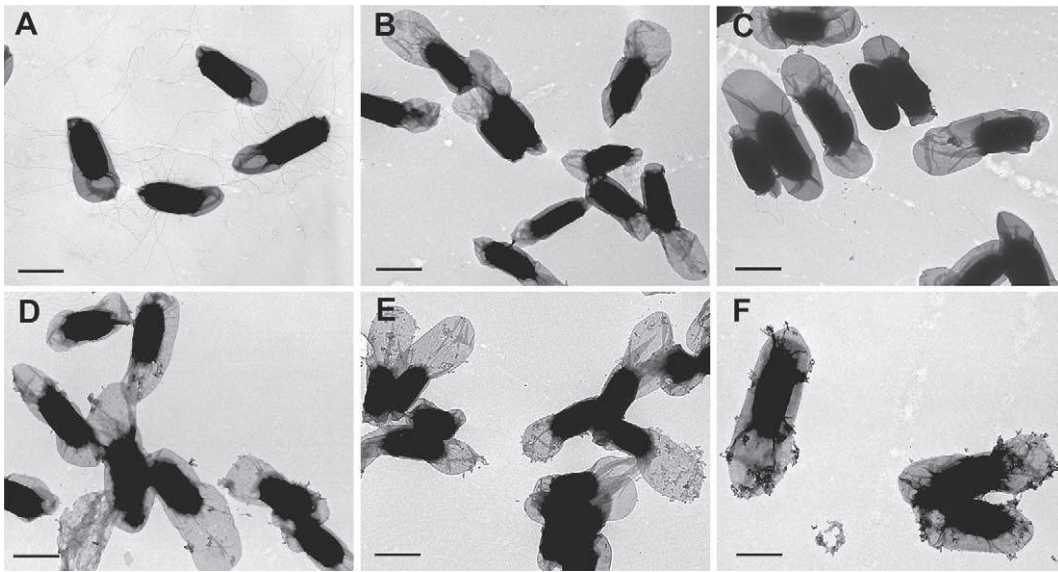


Fig. 4. Transmission electron microscopy on treated spores after negative staining. *B. cereus* 98/4 spores treated with 0.5% NaOH at 60 °C (A), *B. cereus* 98/4 spores (B), *B. cereus* 07/1 spores (C), *B. cereus* ATCC 14579^T spores (D), *B. cereus* 5832 spores (E), *B. cereus* D6 spores (F) treated with 2% NaOH at 80 °C.

3.4. Effects of temperature and NaOH treatments on the ability of spores to adhere

When spore adhesion was investigated by the immersion of stainless steel coupons in spore suspensions, a treatment by 0.5%

NaOH 60 °C for 30 min induced a decrease (ranging from 15 to 71%) in the number of adherent culturable spores (Table 2) for all strains except *B. cereus* 07/1. Differences in the number of adherent spores were only clearly significant for *B. cereus* 5832 (*p*-value of 0.010).

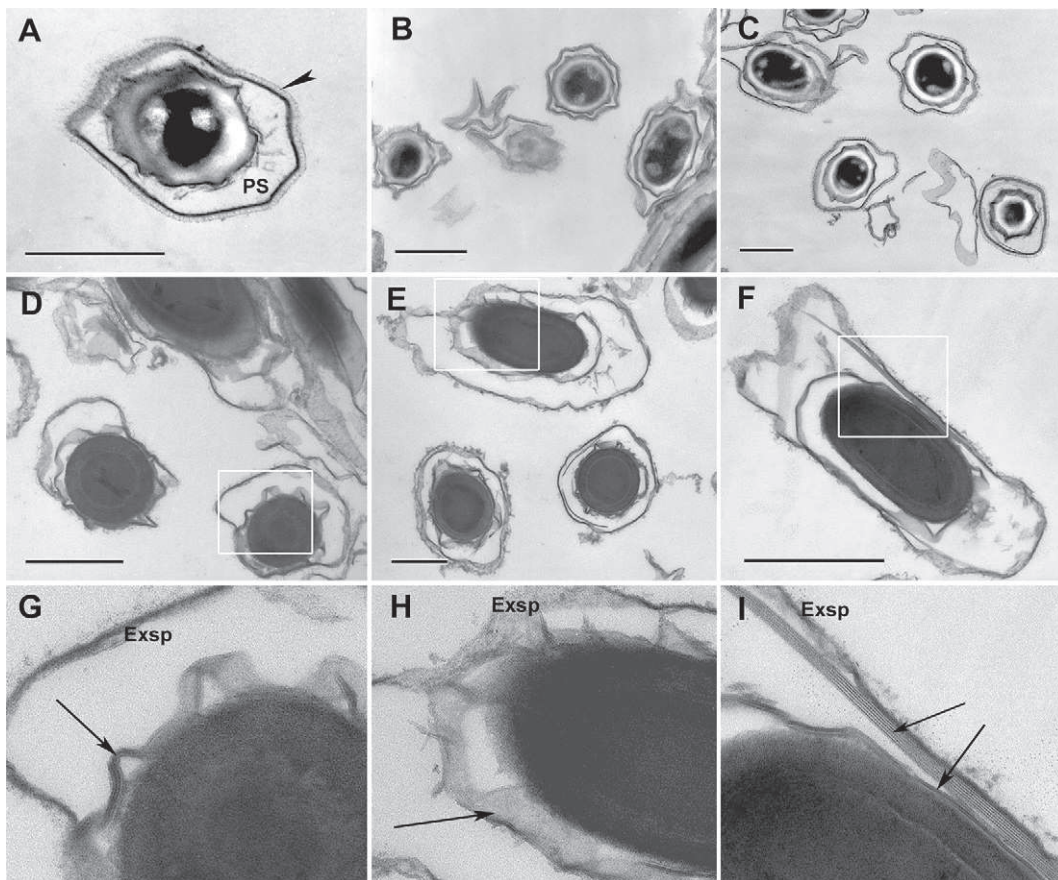


Fig. 5. Transmission electron microscopy on spore sections after ruthenium staining untreated (A–C) or treated with 2% NaOH at 80 °C (D–I). *B. cereus* 98/4 (A, D, G), *B. cereus* ATCC 14579^T (B, E, H), *B. cereus* D6 (C, F, I).

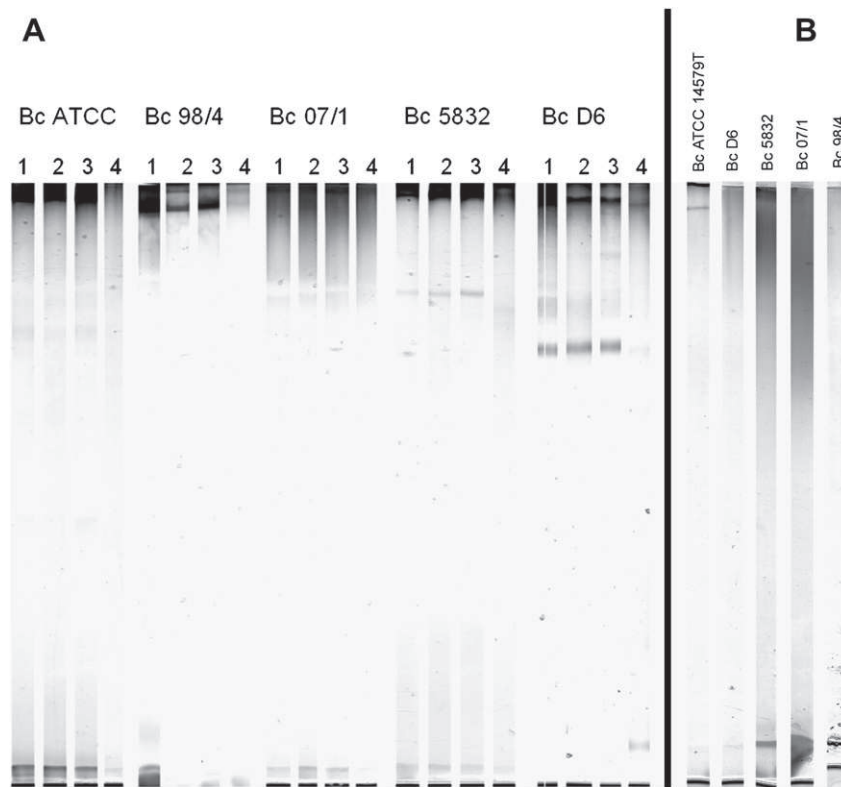


Fig. 6. Electrophoretic profiles of *B. cereus* spore extracts stained by PAS. A: spores untreated (1) or treated with water at 60 °C (2), NaOH at 20 °C (3) and NaOH at 60 °C (4). B: spore treated with 2% NaOH at 80 °C.

When spores were subjected to 2% NaOH at 80 °C, the percentage of culturable spores was too low (around 0.001%) to estimate spore adhesion as above. Indeed, a spore concentration of around 10^5 culturable spores ml^{-1} (around 10^{10} spores ml^{-1}) was required during the contamination step. Therefore, a new spore adhesion test on silicone tubing was developed. Pieces of silicone were immersed in spore suspensions of around 10^3 spores ml^{-1} , and spore adhesion was estimated by the decrease in the number of spores in the suspensions. First, the concentration of spores in the silicon adhesion test was similar to the stainless steel adhesion test in order to compare both adhesion models (Table 2). The same trend was obtained by both methods. Spores of *B. cereus* 98/4 and *B. cereus* D6 were the most adherent to silicone and stainless steel and spores of *B. cereus* ATCC 14579^T were the least. We therefore considered that the same spore properties were involved in spore adhesion to stainless steel and silicone, and that results of both methods could be compared. Following treatment with 2% NaOH at 80 °C, a significant decrease (*p*-values ranging from 0.0112 to 0.0435) in the percentage of culturable spores able to adhere was observed for four strains: *B. cereus* ATCC 14579^T, 98/4, 5832 and D6.

Table 1

Formation of colonies of *B. cereus* spores treated with 2% NaOH at 80 °C. Percentage of CFU after 1, 2, 3, 4 or 5 day of incubation on nutrient agar at 30 °C.

Strain	Time of incubation				
	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days
Bc ATCC 14579 ^T	82.0	100	100	100	–
Bc 98/4	1.5	67.6	93.4	100	–
Bc 07/1	1.0	75.3	98.9	100	–
Bc 5832	3.3	8.3	43.3	97.1	100
Bc D6	73.7	97.9	98.9	100	–

Among these 4 sensitive strains, *B. cereus* D6 was clearly less affected than the 3 other strains.

3.5. Spore re-adhesion to food processing line surfaces (pipes, valves) during CIP procedures

Due to the high level of adhering culturable spores required to perform this experiment, we only investigated the detachment of spores treated by 0.5% NaOH at 60 °C. The NaOH 0.5% at 60 °C treatment did not induced statistically significant reduction of the percentage of surviving spores (data not shown).

Because detached spores are probably able to re-adhere during CIP procedures, we investigated the ability of spores suspended in NaOH to adhere to equipment surfaces of a CIP rig. *B. cereus* 98/4, isolated from a food processing line was chosen to perform these experiments. Spores were directly suspended in water at room temperature (control) or in 0.5% NaOH at 60 °C and circulated for

Table 2

Ability of spores to adhere to stainless steel coupons (0.5% NaOH treatment) and to silicone tubing (2% NaOH treatment), and *p*-values for each strain/treatment.

	Bc ATCC	Bc 98/4	Bc 07/1	Bc 5832	Bc D6
0.5% NaOH ^a					
Control	5.25×10^5	2.55×10^6	9.83×10^5	1.35×10^6	1.02×10^7
Treated	3.51×10^5	2.04×10^6	1.06×10^6	1.15×10^6	2.98×10^6
<i>p</i> -values	0.0413	0.3844	0.7462	0.0010	0.0573
2% NaOH ^b					
Control	80.66	98.14	84.02	88.46	98.10
Treated	23.42	30.85	92.60	27.04	47.03
<i>p</i> -values	0.0323	0.0112	0.2344	0.0435	0.0241

^a Number of adherent spores expressed in log cfu.

^b Percentage of adherent spores.

30 min in a CIP rig. The contamination level of pipes, located at various sites inside the CIP rig, was estimated by moulding the internal surfaces of pipes with TTC-agar. The use of 0.5% NaOH at 60 °C reduced the contamination level by 31–54% (p -values <0.0001) compared to the use of water (Fig. 7). Re-adhesion levels also differed according to the position in the CIP rig (p -value = 0.0015). Tukey's grouping analysis also indicated that the contamination level was significantly higher on tubes in position 2, located near a bend, than tubes in position 1, located downstream a straight pipe (Fig. 7).

4. Discussion

B. cereus spores are frequently isolated from food processing lines (Flint et al., 1997; Tauveron et al., 2006), essentially due to their ability to adhere firmly to inert materials (Faille et al., 2002; Seale et al., 2008) and to resist chemical and heat-treatments (Faille et al., 2001; Jullien et al., 2003). It is likely that some of these properties are directly related to the presence of an external loose-fitting outermost membrane called exosporium, common to all members of the *B. cereus* group (Henriques and Moran, 2007). These exosporia also contain enzymes required for spore germination (Redmond et al., 2004). However, this exosporium has been shown to be sometimes injured, either naturally, the prevalence of spores with injured exosporia being either governed by the sporulation conditions (Faille et al., 2007), or consequent to detrimental conditions such as the combination of high temperature and NaOH concentration used in CIP procedures. To our knowledge, no results have as yet been presented on the occurrence of spore injury and/or survival rate following CIP. However, a recent works have recently demonstrated the possible re-adhesion of detached spores during CIP (Le Gentil et al., 2010), and that spore surface changes induced by environmental conditions could affect their adhesion properties (Faille et al., 2007). We are consequently led to hypothesize that conditions encountered during CIP procedures would affect spore surface properties and therefore modify the ability of detached spores to re-adhere to processing line surfaces downstream.

In order to rule out the potential effect of NaOH and high temperature on spore injury and adhesion, we treated *B. cereus* spores with 0.5% NaOH at 60 °C and 2% NaOH at 80 °C, both conditions being representative of conditions encountered in food industries during CIP procedures (Lelièvre et al., 2001). This study was performed on spores of five *B. cereus* strains from different origins and characterized by distinct surface properties.

As previously shown in our laboratory, temperature alone did not damage *B. cereus* spores. Indeed, a 10 min treatment at 85 °C

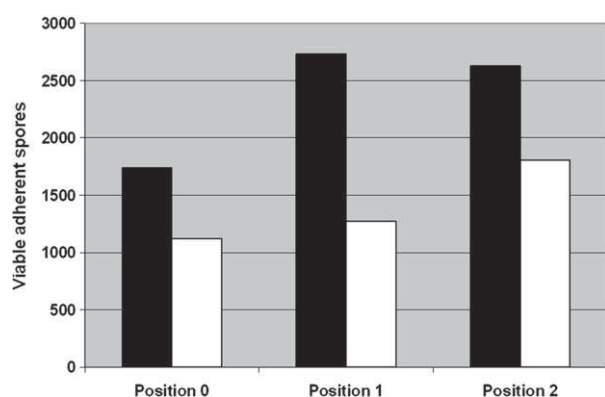


Fig. 7. Ability of spores suspended in water (black bars) or in 0.5% NaOH at 60 °C (white bars) to adhere to stainless steel pipes inserted into a pilot CIP rig (number of viable adherent spores per 100 cm²).

failed to clearly affect either the surface properties or the adhesion of *B. cereus* 98/4 and *B. cereus* ATCC 14579^T spores (data not shown). This observation was confirmed during this study as was the failure of 0.5% NaOH at room temperature to damage spores. Conversely, due to the combination synergy of temperature (60 °C) and NaOH (0.5%) consistently damaged appendages: thin appendages were no longer detectable and 10-nm appendages became curled. Increasing both NaOH concentration (2%) and temperature (80 °C) increased damages in spores: all appendages were lost, and the exosporia appeared crumpled but not disrupted. A closer look at exosporia also showed that 2% NaOH at 80 °C caused significant damage to exosporium components: the hair-like nap was totally destructured. This observation was confirmed by electrophoretic glycoprotein profiles: a loss of the 200–250 kDa glycoprotein complex and of lower glycoprotein bands. Lastly, 2% NaOH at 80 °C also affected sub-exosporial structures. The presence of higher number of planar inclusion inside the perisporal space reflected the partial disruption of the coat structure. The coat injury would also sensitize surviving spores to inactivation agents, such as oxidants like chlorine dioxide, hypochlorite, or even hydrogen peroxide (Setlow, 2003).

These observations first suggest that surviving spores would encounter some difficulties in forming colonies, resulting either from the inactivation of germination enzymes on the exosporium, or from coat injuries. Indeed, we observed that, whatever the strain, the number of adherent viable spores was poorly affected by a treatment with 0.5% NaOH at 60 °C, but was clearly reduced (up to 10³-fold) following treatment with 2% NaOH at 80 °C. These observations suggested that the difficulties of spores to form colonies would result of the inactivation of germination enzymes in the exosporium and in coat or from even deeper injuries of growth physiological process not visible by microscopy. Our results also showed that the time taken for spores to form colonies after the 2% NaOH treatment differed from one strain to another, suggesting that the spore damage by alkaline cleaning procedure was strain-dependent. For example, *B. cereus* ATCC 14579^T and D6 spores were barely damaged while *B. cereus* 5832 spores needed up to 5 days to recover. Surprisingly, both strains isolated from food industries (*B. cereus* 98/7 and 07/1) were quite sensitive to NaOH treatment.

The modifications to the spore's outermost structures following NaOH treatments also suggest changes in its ability to contaminate equipment surfaces. Indeed, we observed that high NaOH concentrations combined with high temperature affected spore adhesion and that this effect was strain-dependent. That of *B. cereus* ATCC 14579^T, 98/4 and 5832 was reduced over 3-fold, whilst the adhesion of *B. cereus* 07/1 spores was unaffected. Appendages (Hüsmark and Rönner, 1992; Klavenes et al., 2002) and exosporium integrity (Faille et al., 2007) or the outermost hair-like nap (Brahmbhatt et al., 2007), damaged by hot NaOH are suspected of being involved in adhesion and/or resistance to cleaning. The spore surface damages caused by hot NaOH would also modify physico-chemical properties such as hydrophobicity, suspected to play a major role in spore adhesion (Faille et al., 2002; Rönner et al., 1990; Wiencek et al., 1991). Unfortunately, due to the very low percentage of culturable spores in the contamination batch, it was not possible to investigate their own hydrophobicity nor to draw conclusions about its effect on spore adhesion. Our results do however show that the two strains whose spore adhesion was least affected by high NaOH concentrations (*B. cereus* D6 and 07/1) retained some appendages following the treatment. Thus, it might be hypothesized that these spores were injured to a lesser extent than the others.

These results, obtained from models at laboratory scale suggest a contamination risk to equipment surface during CIP procedures, especially when spores are protected from stressful conditions, as

for example irregular surfaces (Boyd et al., 2002; Verran et al., 2001), between gaskets and materials (Austin and Bergeron, 1995; Mettler and Carpentier, 1997) or in the presence of food soil (Kreske et al., 2006).

To investigate the surface contamination by spores during CIP, we investigated the ability of spores suspended in a caustic solution to contaminate equipment surfaces. Straight pipes were chosen as model equipment and the level of adhesion was estimated at different locations of the CIP rig. Despite the fact that straight pipes are not considered to be poorly hygienic areas inside processing lines (ISO 14159 standard), surface contamination clearly occurred during CIP, although to a lesser extent than in water. The extrapolation of our results to the whole surface of the CIP rig ($\sim 3.2 \text{ m}^2$) indicated that between 0.027% (from the value in position 0) and 0.043% (from the value in position 2) of the spores detached during the CIP procedure would re-adhere along the CIP rig. As expected, the position in the loop also played a major role in the re-adhesion phenomenon during CIP procedure. Palmer et al. (2007) also underlined the importance of plant design in controlling microbial contamination and ease of cleaning. In our geometry, the differences in the contamination level between positions 0 and 1 and position 2 might result from the presence of a bend placed upstream of the pipe in position 2, which provokes flow disturbance downstream (Blel et al., 2009). These differences have already been observed in previous work (Le Gentil et al., 2010).

In conclusion, a small percentage of adherent *B. cereus* spores was able to resist the conditions found during CIP procedures. Despite their low number, these surviving spores are of concern in the food industry, for the following two reasons. Firstly, most of these spores are injured and are therefore difficult to detect in the recovery media used to enumerate surviving spores in foods. Secondly, these spores are able to contaminate surfaces downstream and would be a risk for further food contamination.

Acknowledgements

This work has been financed by the « Agence Nationale de la Recherche » under the « Programme National de Recherche en Alimentation et Nutrition Humaine », project « ANR-05-PNRA-013, *B. cereus* » and project « ANR-07-PNRA-009, InterSpore ».

M. Clarisse, J.F. Migdal, A. Ronse and G. Ronse are thanked for their valuable assistance in the laboratory. We are also grateful to E. Dewailly, from INSERM U800, for technical assistance provided for transmission electron microscopy.

References

- Austin, J.W., Bergeron, G., 1995. Development of bacterial biofilms in dairy lines. *J. Dairy Res.* 62, 509–519.
- Blel, W., Pierrat, D., Le Gentil, C., Legentilhomme, P., Legrand, J., Hermon, C., Faille, C., Bénézech, T., 2009. Numerical and experimental investigations of the flow structures through a gradual expansion pipe. *Trends Food Sci. Technol.* 20, S70–S76.
- Boyd, R.D., Verran, J., Jones, M.V., Bhakoo, M., 2002. Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. *Langmuir* 18, 2343–2346.
- Brahmbhatt, T.N., Janes, B.K., Stibitz, E.S., Darnell, S.C., Sanz, P., Rasmussen, S.B., O'Brien, A.D., 2007. *Bacillus anthracis* exosporium protein Bc1A affects spore germination, interaction with extracellular matrix proteins, and hydrophobicity. *Infect Immun.* 75, 5233–5239.
- Faille, C., Dennin, L., Bellon-Fontaine, M.N., Bénézech, T., 1999. Cleanability of stainless steel surfaces soiled by *Bacillus thuringiensis* spores under various flow conditions. *Biofouling* 14, 143–151.
- Faille, C., Fontaine, F., Bénézech, T., 2001. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *J. Appl. Microbiol.* 90, 892–900.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., Bénézech, T., 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* 48, 728–738.
- Faille, C., Membré, J.M., Tissier, J.P., Bellon-Fontaine, M.N., Carpentier, B., Laroche, M.A., Bénézech, T., 2000. Influence of physicochemical properties on the hygienic status of stainless steel with various finishes. *Biofouling* 15, 261–274.
- Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelièvre, C., Slomianny, C., 2007. Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *J. Food Prot.* 70, 2346–2353.
- Flint, S.H., Bremer, P.J., Brooks, J.D., 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant. Description, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11, 81–97.
- Hachisuka, Y., Kozuka, S., Tsujikawa, M., 1984. Exosporia and appendages of spores of *Bacillus* species. *Microbiol. Immunol.* 28, 619–624.
- Henriques, A.O., Moran, C.P., 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Ann. Rev. Microbiol.* 61, 555–588.
- Hüsmark, U., Faille, C., Rönner, U., Bénézech, T., 1999. *Bacillus* spores and moulding with TTC AGAR. A useful method for the assessment of food processing equipment cleanability. *Biofouling* 14, 15–24.
- Hüsmark, U., Rönner, U., 1992. The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling* 5, 335–344.
- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Lebret, V., Faille, C., 2003. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *J. Food Eng.* 56, 77–87.
- Klavenes, A., Stalheim, T., Sjøvold, O., Kosefsen, K., Granum, P.E., 2002. Attachment of *Bacillus cereus* spores with and without appendages to stainless steel surfaces. *Trans. IChemE Part C* 80, 312–318.
- Kreske, A.C., Ryu, J.H., Beuchat, L.R., 2006. Evaluation of chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer for effectiveness in killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in suspensions, on the surface of stainless steel, and on apples. *J. Food Prot.* 69, 1892–1903.
- Le Gentil, C., Sylla, Y., Faille, C., 2010. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *J. Food Eng.* 96, 37–42.
- Lelièvre, C., Faille, C., Bénézech, T., 2001. Removal kinetics of *Bacillus cereus* spores from stainless steel pipes under CIP procedure: influence of fouling and cleaning conditions. *J. Food Proc. Eng.* 24, 359–379.
- Mettler, E., Carpentier, B., 1997. Location, enumeration and identification of the microbial contamination after cleaning of EPDM gaskets introduced into a milk pasteurization line. *Lait* 77, 489–503.
- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 577–588.
- Peng, J.S., Tsai, W.C., Chou, C.C., 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 11–18.
- Plomp, M., Leighton, T.J., Wheeler, K.E., Malkin, A.J., 2005. Architecture and high-resolution structure of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore coat surfaces. *Langmuir* 21, 7892–7898.
- Redmond, C., Baillie, L.W., Hibbs, S., Moir, A.J., Moir, A., 2004. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology* 150, 355–363.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212.
- Rönner, U., Hüsmark, U., Henriksson, A., 1990. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 550–556.
- Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J., Bremer, P.J., 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 731–737.
- Setlow, P., 2003. Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 550–556.
- Sharma, M.M., Chamoun, H., Sita Rama Sarma, D.S.H., Schechter, R.S., 1992. Factors controlling the hydrodynamic detachment of particles from surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 149, 121–134.
- Simmonds, P., Mossel, B.L., Intaraphan, T., Deeth, H.C., 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *J. Food Prot.* 66, 2070–2075.
- Stalheim, T., Granum, P.E., 2001. Characterization of spore appendage from *Bacillus cereus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 91, 839–845.
- Steichen, C., Chen, P., Kearney, J.F., Turnbough, C.L., 2003. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J. Bacteriol.* 185, 1903–1910.
- Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., Mock, M., 2003. Polymorphism in the collagen-like region of the *Bacillus anthracis* BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *J. Bacteriol.* 185, 1555–1563.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., Faille, C., 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in the spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 254–262.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbiol. Ecol.* 17, 1–15.
- Verran, J., Rowe, D.L., Boyd, R.D., 2001. The effect of nanometer dimension topographical features on the hygienic status of stainless steel. *J. Food Prot.* 64, 1183–1187.
- Waller, L.N., Fox, N., Fox, K.F., Fox, A., Price, R.L., 2004. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Methods* 58, 23–30.
- Wiencek, K.M., Klapes, N.A., Foegeding, P.M., 1991. Adhesion of *Bacillus* spores to inanimate materials: effects of substratum and spore hydrophobicity. *Biofouling* 3, 139–149.
- Yiantsios, S.G., Karabelas, A.J., 1995. Detachment of spherical microparticles adhering on flat surfaces by hydrodynamic forces. *J. Colloid Interface Sci.* 176, 74–85.

ANNEXES

Sommaire

Annexe 1 : Les milieux de cultures	B
Gélose nutritive	B
TSB.....	B
Eau milliQ	B
TSB dilué au 10 ^{ème} + Tween 2%.....	B
Annexe 2 : Conditionnement des surfaces d'acier inoxydable	C
Annexe 3 : Validation de la méthode de raclage aux pistons	D
Méthode de formation de biofilm et validation du système du piston	D
Suivie de croissance	D
Validation de la méthode de récupération du biofilms par système de piston.	G
Annexe 4 : Formation des groupes de contamination	I
Écriture du tableau de contingence	I
Analyse en Composantes Principales Normées (ACPN).....	I
Regroupement des zones selon leur nettoyabilité	J
Formation de groupes préliminaires :	J
Formation de groupes intermédiaires :.....	J
Homogénéité des groupes intermédiaires :	K
Différentiation des groupes homogènes :.....	K
Annexe 5 : Tableaux des Paramètres d'ajustement de la cinétique d'élimination des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	M
Annexe 6 : Tableaux des Paramètres d'ajustement de la cinétique d'élimination des biofilms de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	N
(trempage chimique)	N
Annexe 6 : Tableaux des Paramètres d'ajustement de la cinétique d'élimination des biofilms de <i>B.cereus</i>	O
Bacillus.sp CCL 9	O
<i>Bacillus cereus</i> 98/4	P
Bacillus cereus D 22.....	Q

Annexe 1 : Les milieux de cultures

Gélose nutritive

-Agar bactériologique de type E à 15g/L

-Bouillon nutritif à 13g/L

-Eau osmosée Qsp

Le milieu doit atteindre l'ébullition puis il est autoclavé à 121°C durant 30 minutes.

TSB

-TSB à 30g/L

-Eau osmosée Qsp

La solution est ensuite autoclavée à 121°C durant 20 minutes.

Eau milliQ

Eau distillée filtrée sur des résines puis autoclavée à 121°C durant 20 minutes.

TSB dilué au 10^{ème}+ Tween 2%

-20g de Tween 2% pour 1 Litre

-TSB dilué au 10^{ème}

La solution est ensuite autoclavé à 121°C durant 20 minutes.

Annexe 2 : Conditionnement des surfaces d'acier inoxydable

Le conditionnement des coupons ou des tubulures est réalisé afin de faire vieillir l'acier pour qu'ils aient des propriétés proches de celles qu'on pourrait rencontrer dans les industries laitières. Cela commence par le dégraissage des surfaces avec une solution d'éthanol (95%)/ acétone 50/50, puis un rinçage à l'eau dure.

Ensuite un nettoyage par du RBS 35 pur suivi du frottage des coupons avec des gants (marque Mappa), puis un rinçage à l'eau dure.

Les coupons ou les tubulures peuvent alors subir 15 cycles de conditionnement. Les étapes d'un cycle de conditionnement sont les suivantes :

- Immersion des coupons ou remplissage des tubes pendant 30 minutes dans du lait à température ambiante ;
- Vidange du lait puis rinçage durant 5 minutes à l'eau osmosée par débordement ;
- Immersion pendant 10 minutes dans de la soude à 0.5% à une température de 70°C ;
- Vidange de la soude et rinçage durant 5 minutes à l'eau osmosée par débordement.

Annexe 3 : Validation de la méthode de raclage aux pistons

Méthode de formation de biofilm et validation du système du piston

Suivi de croissance

Comme décrit dans le chapitre II, le biofilm de Pseudomonas est formé en 48 h dans du lait dilué et celui de Bacillus dans du TSB dilué au dixième. Ainsi, pour chacune des souches utilisées lors de l'étude un suivi de croissance a été réalisé. Le but de ce suivi de croissance était surtout pour la souche Bacillus de savoir à partir de quel moment commence la sporulation. Nous avons pour cela suivi la croissance sur, 2, 6, 12, 24 et 48 h. Pour chaque temps, un dénombrement du biofilm total et des images du biofilms ont été prises.

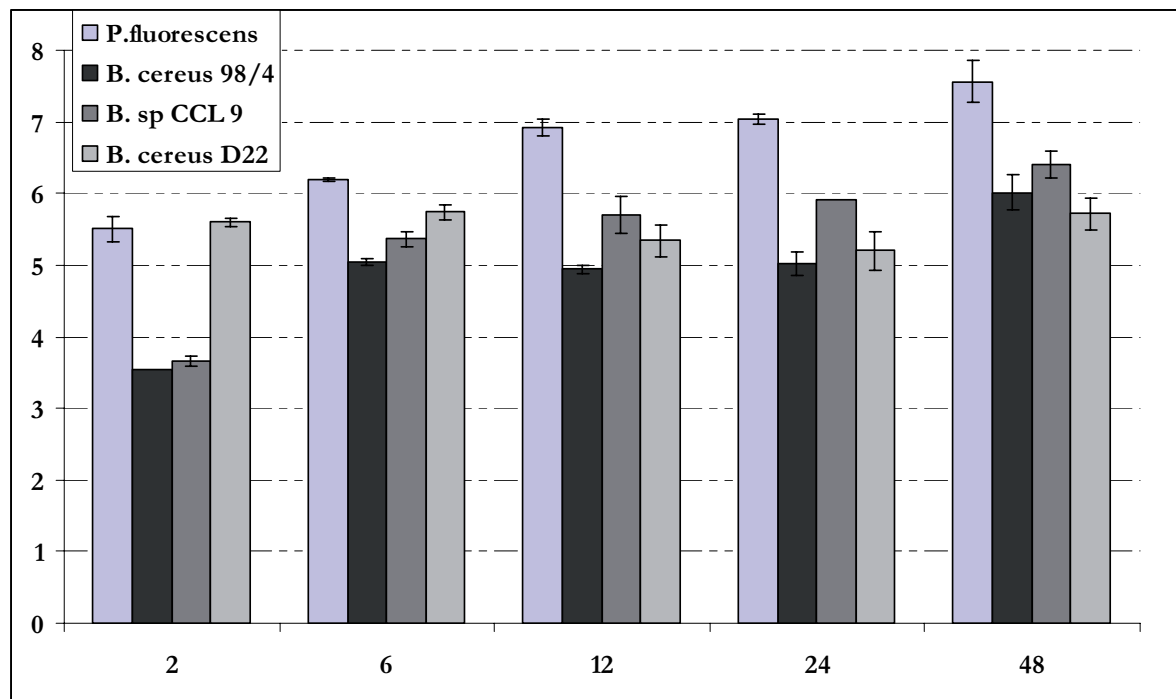
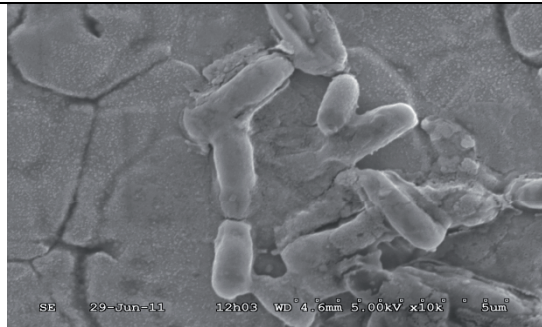


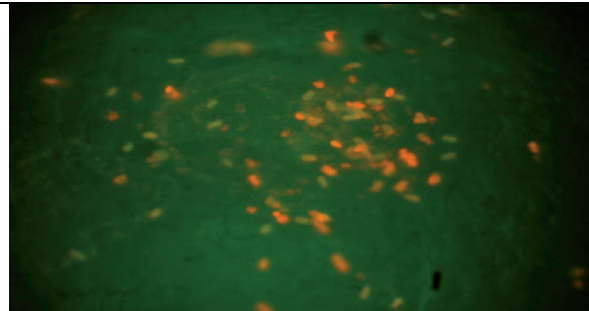
Figure .1: Suivi de croissances des biofilms des souches bactériennes utilisées lors de l'étude.

Les biofilms de Bacillus à 48 heures ont une ufc.cm⁻² qui varient entre 5 et 6 Log, alors que celle de Pseudomonas est de l'ordre de 7 Log. Le suivi image de la croissance a permis de savoir que les spores dans les biofilms de Bacillus sont visible à partir de 12 h de formation. Les images ci-dessous illustrent ces observations. La présence d'exospores sur

les images MEB et de cellules colorées en vert sur les images de la microscopie épifluorescente.



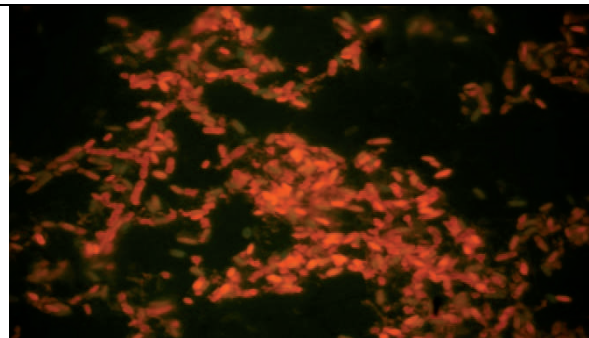
B. cereus 98/4 (x) biofilm à 12 h



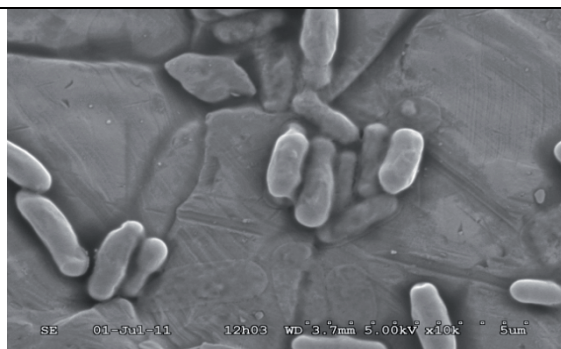
B. cereus 98/4 (x 100) biofilm à 12 h



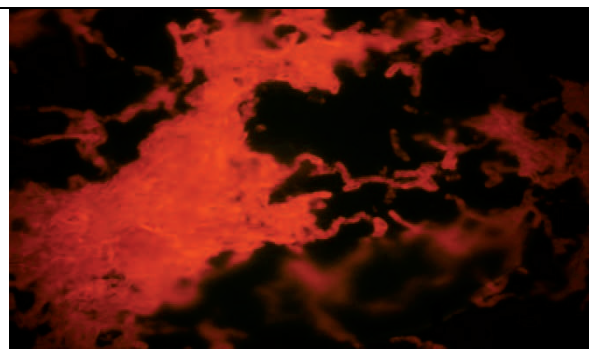
B. cereus 98/4 (x) biofilm à 48 h



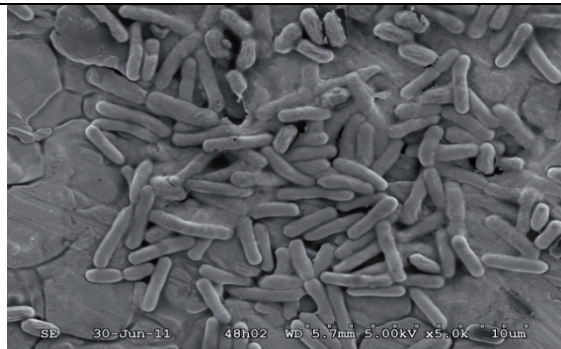
B. cereus 98/4 (x 100) biofilm à 48 h



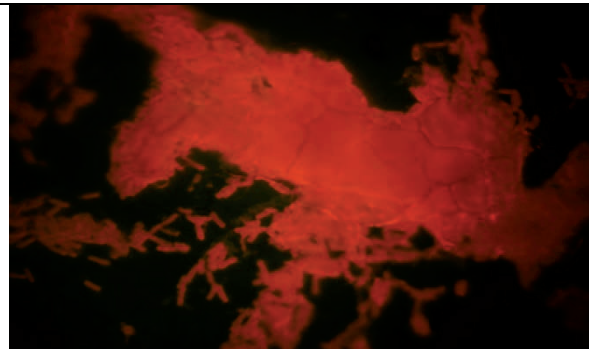
B. sp CCL 9 (x) biofilm à 12 h



B. sp CCL 9 (x 100) biofilm à 12 h



B. sp CCL 9 (x) biofilm à 48 h



B. sp CCL 9 (x 100) biofilm à 48 h

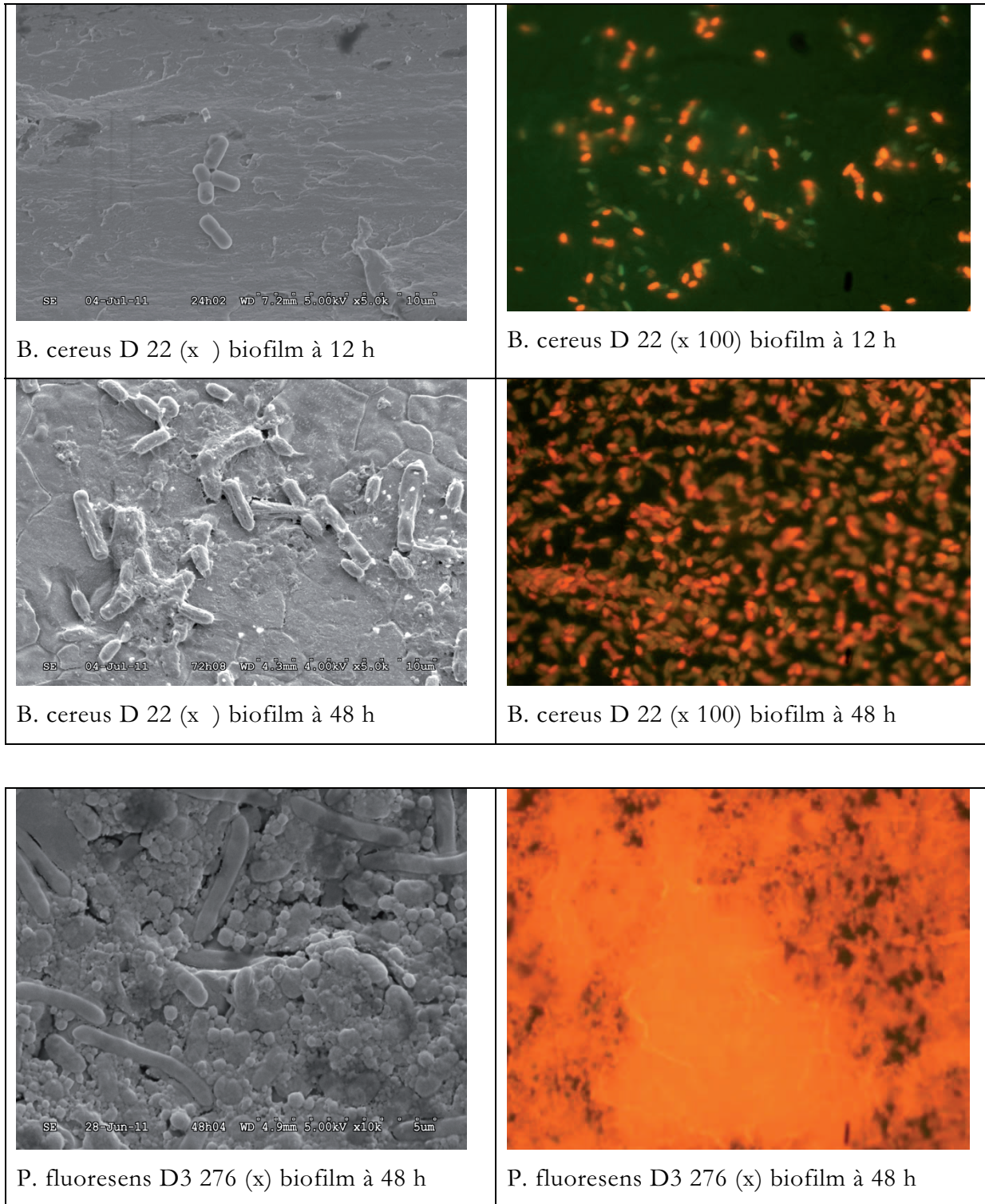


Figure .2 : Imagerie MEB et microscopie épifluorescente de l'évolution du biofilm modèle à 24 et 48h de croissance.

Validation de la méthode de récupération du biofilms par système de piston.

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur les cinétiques de nettoyage ont été réalisés sur des spores de *Bacillus cereus* avec des concentrations faible dont dénombrable par la méthode de moulage de Husmarck et al, (1999) (Gélose nutritive additionné 0.1% TTC).

Cependant, il faut noter que cette méthode présente des limites quand les concentrations résiduelles sont élevées. C'est le cas avec l'étude réalisée avec les biofilms à *Pseudomonas*.

L'évaluation de l'efficacité du piston dans le détachement des bactéries résiduelle avant et après le nettoyage des tubes cylindre a nécessité l'utilisation de 3 paires de tubes notées test 01, test 02, et test 03. Pour effectuer cet essai, du biofilm est préalablement formé pendant 48 h. La solution encrassante initiale a une concertation de 105 ufc.ml-1.

Afin de vérifier l'efficacité des pistons, les tubes sont moulés après le raclage. Ainsi, nous avons réalisés plusieurs essais, c'est à dire que dans le tube test 01, nous effectuons un passage du piston, puis 2 dans le test 02 et enfin trios passages dans le tube noté test 03. Après trois essais nous avons remarqué que les tubes ayant subis le passage successif de 3 pistons n'avaient plus de bactéries sur leurs surfaces.

La méthode de moulage que nous utilisons pour évaluer la contamination résiduelle dans le cas des spores n'est en général pas utilisable avec les biofilms, du moins pour les premiers temps des cinétiques de nettoyage car la contamination résiduelle est trop élevée. Le tableau ci-dessous est un récapitulatif de la moyenne des 3 essais de validation de la méthode du piston.

Tableau .1: Moyenne des résultats de validation du piston dans le décrochement du biofilm

Denombrement	ufc.ml-1	(moulage) ufc.cm-2
Conduites cylindriques	1 passage	5,9.104
	2 passages	2,8.105
	3 passages	1,2.107

Les images ci-dessous représentent les photographies des boudins de gélose avant et après passage successif de trois pistons. Ces images illustrent l'efficacité de la méthode du piston lors de la quantification de la contamination des biofilms à *Pseudomonas*. Ainsi au cours des travaux de thèse cette méthode a été retenue pour le décrochement des cellules résiduelles de *Pseudomonas* après le nettoyage.

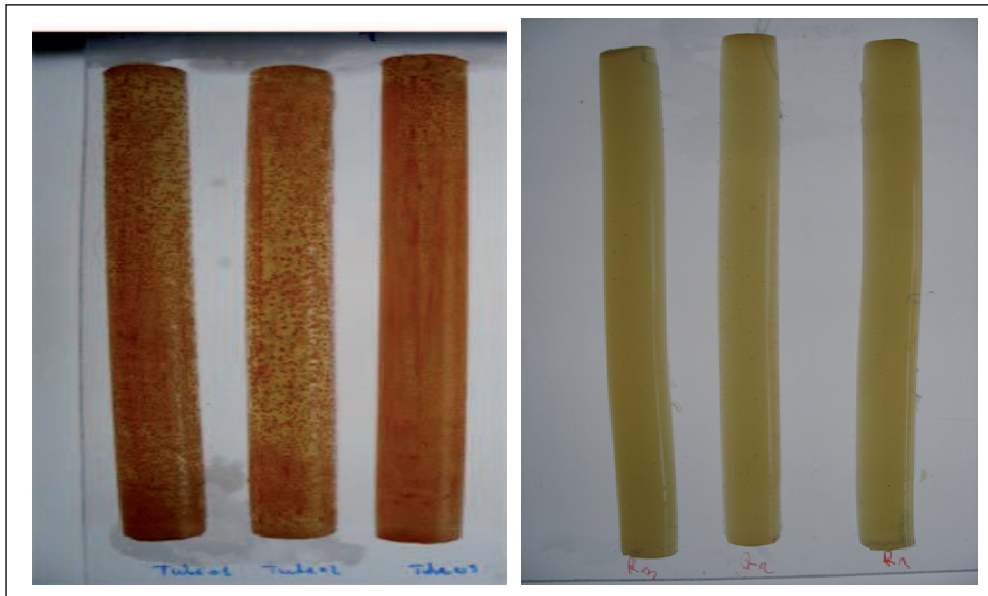


Figure 3: Photographie des boudins de gélose avant (gauche) et après (droite) le passage des pistons.

Annexe 4 : Formation des groupes de contamination

Écriture du tableau de contingence

Pour chaque série d'essais, deux facteurs ont été étudiés, à savoir le facteur zone et le facteur numéro d'essai. Le tableau de contingence dressé contient dans la première colonne les noms des zones et dans les colonnes suivantes les résultats de la contamination spécifique à chaque essai. Pour les zones très contaminées, où le dénombrement est impossible, une valeur arbitraire de 50 UFC.cm⁻² leur est attribuée. Cette valeur constitue la limite maximale que la contamination initiale ou résiduelle ne doit pas dépasser. Pour les zones où le dénombrement n'est pas possible pour des raisons pratiques, un calcul arbitraire permet d'attribuer une valeur :

$$\text{Valeur manquante} = \frac{\text{médiane essai} \times \text{médiane zone}}{\text{médiane totale}}$$

La médiane essai est la valeur médiane de toutes les zones pour un même essai, la médiane zone est la médiane de la zone considérée pour tous les essais et la médiane totale est la médiane de toutes les zones pour l'ensemble des essais.

Analyse en Composantes Principales Normées (ACPN)

L'Analyse en Composantes Principales Normées est une méthode factorielle qui consiste à projeter le nuage de points sur un sous-espace, en perdant le moins d'information possible. Elle s'adapte bien à notre cas d'étude, car nous disposons de variables quantitatives. Le principe adopté dans cette étude consiste à bâtir un repère à n dimensions dont chaque axe correspond à l'une des n répétitions d'une même expérience. Les individus qui correspondent aux zones sont placés dans ce repère, ses coordonnées étant définies par les résultats obtenus à chaque répétition. On obtient alors un nuage de points plus au moins structuré. L'ACPN permet de définir un sous-espace de dimension raisonnable de telle sorte que la projection sur ce sous espace retienne le plus d'information possible et que le nuage de points soit le plus structuré. Les critères suivants doivent être respectés :

- i. le nouveau repère doit être de même dimension que le repère initial,
- ii. ses vecteurs doivent être obtenus par combinaisons linéaires des vecteurs du repère initial,

- iii. les deux premiers vecteurs (et surtout le premier) doivent expliquer une grande partie des résultats observés.

Le tableau de contingence est alors réécrit dans ce nouveau repère.

Regroupement des zones selon leur nettoyabilité

Le principe de la méthode consiste à former des groupes homogènes, chaque groupe doit contenir un ensemble d'individus dont la distance euclidienne par rapport au barycentre du groupe soit la plus faible possible. Le but est donc de réduire la dispersion des individus autour du barycentre du groupe, c'est la notion de minimisation de l'inertie intra-groupes (Lelièvre, 2001). De même, pour que les groupes soient distincts, il faut avoir une inertie intergroupe maximale. Pour aboutir à ce résultat plusieurs étapes sont nécessaires.

Formation de groupes préliminaires :

Une méthode de classification ascendante hiérarchique (CAH) pour un niveau de précision donné est utilisée pour former les groupes préliminaires. Au départ, chaque zone forme un groupe à elle seule (singletons). Les singletons sont ensuite regroupés deux à deux de telle sorte que l'inertie intergroupe soit la plus grande possible. Le regroupement se fait suite à la comparaison de la distance euclidienne entre individus. Après un certain nombre d'itérations, on obtient un seul groupe. Un dendrogramme peut être dressé, il donne la composition des différentes classes ainsi que l'ordre dans lequel elles ont été formées.

Formation de groupes intermédiaires :

La méthode de réallocation (ou d'agrégation autour de centres variables) de Didday est utilisée pour former les groupes intermédiaires. Les barycentres des groupes préliminaires, obtenus au cours de l'étape précédente, sont calculés. Chacun constitue un repère auquel sont affectées les zones dont le barycentre est le plus proche. De nouveaux groupes sont ainsi obtenus avec une inertie intergroupe plus grande que la précédente. Les barycentres de ces nouveaux groupes sont calculés, le même raisonnement est appliqué jusqu'à ce que l'inertie intergroupe n'augmente plus.

Homogénéité des groupes intermédiaires :

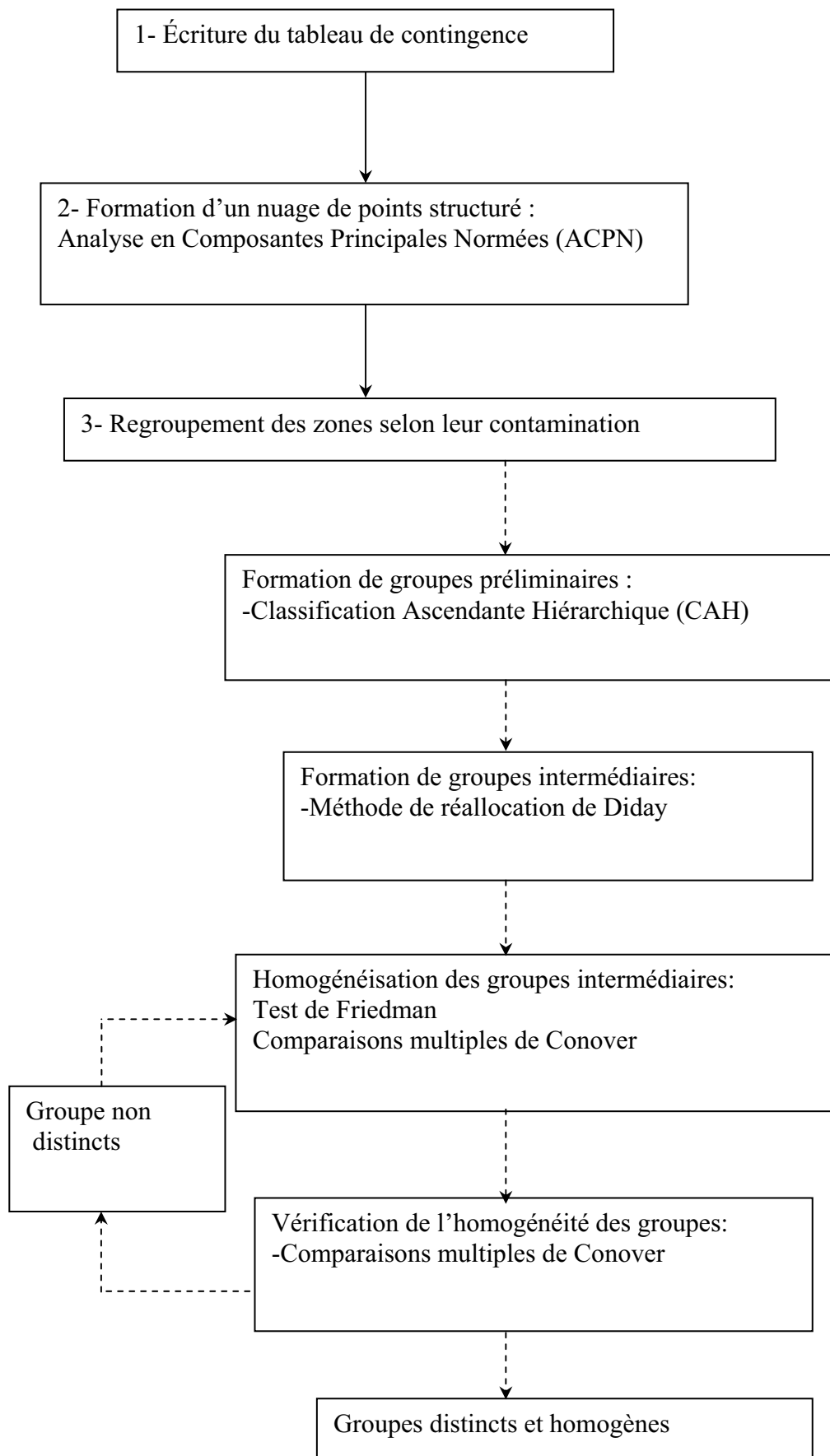
Une comparaison entre zones du même groupe intermédiaire est effectuée avec le test de Friedman afin de vérifier l'homogénéité de chacun des groupes pour un intervalle de confiance de 10 %. Le groupe est considéré homogène si le test est négatif. Il est positif si au moins un individu est différent des autres. Dans ce cas, les éléments du groupe sont de nouveau comparés deux à deux par la méthode de comparaisons multiples de Conover (1980). Si une zone est considérée différente des autres, elle est extraite du groupe pour former un singleton et l'homogénéité des groupes est de nouveau testée. Les singletons extraits à chaque homogénéisation de groupes sont réaffectés au groupe dont le barycentre est le plus proche.

Différentiation des groupes homogènes :

Les groupes homogènes ainsi formés sont ensuite comparés deux à deux par la méthode de Conover. Si seuls deux groupes ne sont pas différenciés, ils sont alors rassemblés. Si plusieurs couples de groupes sont indifférenciés, les deux groupes fusionnés sont ceux dont la p-value est la plus élevée.

Le test de Friedman est de nouveau appliqué pour tester l'homogénéité des nouveaux groupes, les itérations successives permettent donc l'obtention de groupes distincts et homogènes.

L'ensemble de la méthode statistique a été programmé au sein du laboratoire Pihm de Villeneuve d'Ascq. Elle est expliquée sur l'organigramme de la figure ci-dessous.



**Annexe 5 : Tableaux des Paramètres d'ajustement de la cinétique
d'élimination des biofilms de Pseudomonas fluorescens**

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 0,144 Pa	
f	0.9924	0.00254	Mean Sum of Squared Error	0.0408
kmax1	3.90	0.46	Root Mean Sum of Squared Error	0.2019
kmax2	0.07	0.01	R-Square	0.9608
LOG10(N0)	7.25	0.12	R-Square adjusted	0.9546

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 1,56 Pa	
f	0.9991	0.00048	Mean Sum of Squared Error	0.1012
kmax1	6.98	1.46	Root Mean Sum of Squared Error	0.3181
kmax2	0.11	0.02	R-Square	0.9552
LOG10(N0)	7.20	0.18	R-Square adjusted	0.9478

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 4,56 Pa	
f	0.9984	0.00140	Mean Sum of Squared Error	0.2119
kmax1	9.90	1.21	Root Mean Sum of Squared Error	0.4604
kmax2	0.15	0.03	R-Square	0.8884
LOG10(N0)	7.14	0.33	R-Square adjusted	0.8708

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 20 Pa	
f	0.9991	0.00083	Mean Sum of Squared Error	0.2141
kmax1	14.19	0.34	Root Mean Sum of Squared Error	0.4627
kmax2	0.30	0.04	R-Square	0.9613
LOG10(N0)	7.21	0.27	R-Square adjusted	0.9535

**Annexe 6 : Tableaux des Paramètres d'ajustement de la cinétique
d'élimination des biofilms de *Pseudomonas fluorescens***

(trempage chimique)

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 0,1% -NaOH	
f	0.9995	0.00058	Mean Sum of Squared Error	0.5095
kmax1	3.36	1.27	Root Mean Sum of Squared Error	0.7138
kmax2	0.01	0.02	R-Square	0.8638
LOG10(N0)	7.11	0.36	R-Square adjusted	0.8453

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 0,35% -NaOH	
f	0.9998	0.00005	Mean Sum of Squared Error	0.0145
kmax1	4.57	0.42	Root Mean Sum of Squared Error	0.1206
kmax2	0.02	0.01	R-Square	0.9924
LOG10(N0)	7.26	0.12	R-Square adjusted	0.9901

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 0,45% -NaOH	
f	0.9998	0.00002	Mean Sum of Squared Error	0.0126
kmax1	2.10	0.21	Root Mean Sum of Squared Error	0.11067
kmax2	0.01	0.01	R-Square	0.9994
LOG10(N0)	7.26	0.12	R-Square adjusted	0.9961

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 0,5% -NaOH	
f	0.9999	0.00006	Mean Sum of Squared Error	0.0629
kmax1	8.93	1.08	Root Mean Sum of Squared Error	0.2508
kmax2	0.13	0.03	R-Square	0.9840
LOG10(N0)	6.34	0.25	R-Square adjusted	0.9760

Parameters	Parameter values	Standard Error	P.fluorescens 0,6% -NaOH	
f	1.0000	0.00005	Mean Sum of Squared Error	0.0750
kmax1	4.28	0.51	Root Mean Sum of Squared Error	0.2738

kmax2	0.00	0.07	R-Square	0.9844
LOG10(N0)	6.44	0.25	R-Square adjusted	0.9726

Annexe 6 : Tableaux des Paramètres d'ajustement de la cinétique d'élimination des biofilms de *B.cereus*.

***Bacillus.sp* CCL 9**

Parameters	Parameter values	Standard Error	Trempage Eau <i>Bacillus.sp</i> CCL 9	
f	0.6406	1.30330	Mean Sum of Squared Error	0.0042
kmax1	0.09	0.21	Root Mean Sum of Squared Error	0.0650
kmax2	0.00	0.10	R-Square	0.9031
LOG10(N0)	5.73	0.05	R-Square adjusted	0.8305

Parameters	Parameter values	Standard Error	Trempage chimique <i>Bacillus.sp</i> CCL 9	
f	0.9648	0.00814	Mean Sum of Squared Error	0.0066
kmax1	3.73	0.54	Root Mean Sum of Squared Error	0.0809
kmax2	0.02	0.01	R-Square	0.9880
LOG10(N0)	5.92	0.08	R-Square adjusted	0.9790

Parameters	Parameter values	Standard Error	Hydrodynamique <i>Bacillus.sp</i> CCL 9	
f	0.9707	0.01188	Mean Sum of Squared Error	0.0202
kmax1	4.90	1.92	Root Mean Sum of Squared Error	0.1420
kmax2	0.00	0.01	R-Square	0.9618
LOG10(N0)	6.20	0.14	R-Square adjusted	0.9331

Parameters	Parameter values	Standard Error	Hydrodynamique + chimie <i>Bacillus.sp</i> CCL 9	
f	0.9990	0.00016	Mean Sum of Squared Error	0.0032
kmax1	7.81	0.52	Root Mean Sum of Squared Error	0.0562
kmax2	0.00	0.01	R-Square	0.9984
LOG10(N0)	6.20	0.06	R-Square adjusted	0.9972

***Bacillus cereus* 98/4**

Parameters	Parameter values	Standard Error	Trempage Eau <i>Bacillus. cereus</i> 98/4	
f	0.5387	0.27292	Mean Sum of Squared Error	0.0251
kmax1	0.43	0.64	Root Mean Sum of Squared Error	0.1583
kmax2	0.00	0.03	R-Square	0.5442
LOG10(N0)	5.01	0.14	R-Square adjusted	0.2024

Parameters	Parameter values	Standard Error	Trempage chimique <i>Bacillus.cereus</i> 98/4	
f	0.9802	0.00340	Mean Sum of Squared Error	0.0036
kmax1	4.54	0.46	Root Mean Sum of Squared Error	0.0601
kmax2	0.00	0.01	R-Square	0.9943
LOG10(N0)	5.68	0.06	R-Square adjusted	0.9900

Parameters	Parameter values	Standard Error	Hydrodynamique <i>Bacillus. cereus</i> 98/4	
f	0.9030	0.04628	Mean Sum of Squared Error	0.0278
kmax1	2.44	0.99	Root Mean Sum of Squared Error	0.1669
kmax2	0.04	0.02	R-Square	0.9333
LOG10(N0)	5.27	0.17	R-Square adjusted	0.8832

Parameters	Parameter values	Standard Error	Hydrodynamique + chimie <i>Bacillus cereus</i> 98/4	
f	0.9987	0.00029	Mean Sum of Squared Error	0.0066
kmax1	7.33	0.62	Root Mean Sum of Squared Error	0.0810
kmax2	0.01	0.01	R-Square	0.9966
LOG10(N0)	6.08	0.08	R-Square adjusted	0.9940

***Bacillus cereus* D 22**

Parameters	Parameter values	Standard Error	Trempage Eau <i>Bacillus. Cereus</i> D22	
f	0.7318	0.14792	Mean Sum of Squared Error	0.0118
kmax1	0.33	0.19	Root Mean Sum of Squared Error	0.1088
kmax2	0.03	0.02	R-Square	0.9456
LOG10(N0)	5.68	0.11	R-Square adjusted	0.8913

Parameters	Parameter values	Standard Error	Trempage chimique <i>Bacillus.cereus</i> D22	
f	0.9643	0.02085	Mean Sum of Squared Error	0.0249
kmax1	2.01	2.60	Root Mean Sum of Squared Error	0.1579
kmax2	0.02	0.03	R-Square	0.9761
LOG10(N0)	5.70	0.16	R-Square adjusted	0.9403

Parameters	Parameter values	Standard Error	Hydrodynamique <i>Bacillus. cereus</i> D22	
f	0.9357	0.01896	Mean Sum of Squared Error	0.0081
kmax1	1.43	0.46	Root Mean Sum of Squared Error	0.0901
kmax2	0.06	0.01	R-Square	0.9906
LOG10(N0)	5.69	0.09	R-Square adjusted	0.9812

Parameters	Parameter values	Standard Error	Hydrodynamique + chimie <i>Bacillus cereus</i> D22	
f	0.9944	0.00298	Mean Sum of Squared Error	0.0353
kmax1	10.48	100.09	Root Mean Sum of Squared Error	0.1878
kmax2	0.05	0.02	R-Square	0.9762
LOG10(N0)	5.69	0.19	R-Square adjusted	0.9584