



Bioadhésion, nettoyabilité et optimisation de l'utilisation de l'eau dans les opérations d'hygiène

P.Poupault, IFV Val de Loire-Centre pascal.poupault@vignevin.com Tél : 02-47-23-45-11
J-M.Desseigne, IFV Rhône-Méditerranée jean-michel.desseigne@vignevin.com Tél : 04-66-20-67-01
E.Vinsonneau, IFV Bordeaux-Aquitaine emmanuel.vinsonneau@vignevin.com Tél : 05-56-16-14-08

Contexte

Les derniers travaux relatifs au comportement de la levure du genre *Brettanomyces* confirment l'incidence du niveau d'hygiène des surfaces sur le risque de contamination, qui est à l'origine de l'altération. L'amélioration des opérations de nettoyage-désinfection, si elle est envisageable sur site, se heurte à des problèmes de nettoyabilité, des phénomènes de bio-adhésion (relation étroite entre matériau et microorganisme) qu'il convient de mieux connaître (forces d'adhésion). L'optimisation qualitative et environnementale des opérations d'hygiène passe par une meilleure gestion des paramètres hydrodynamiques (nature, débit, temps de contact, indicateur, technologie) mais surtout par une meilleure compréhension du comportement bio-adhésif du microorganisme dans son environnement (stress).

Matériels et méthodes

Comportement bio-adhésif au laboratoire

Dans des conditions statiques maîtrisées, au laboratoire, l'aptitude à l'adhésion est évaluée pour différents microorganismes et les levures du genre *Brettanomyces* (Poupault P., 2015), pour trois matériaux (verre, acier inoxydable, PET) par les tests d'adhésion et des mesures de mobilité électrophorétique. Les observations sont réalisées par microscopie à épifluorescence après coloration. Pour les essais de biofilms, l'observation des structures en trois dimensions obtenues après mise en suspension et remplissage des puits est réalisée à l'aide d'un Microscope Confocale Laser à Balayage (après coloration au Syto 9). L'ensemble des images est analysé avec le logiciel IMARIS pour une reconstruction en 3D, par l'équipe UMR-INRA d'AgroParisTech.

Cinétique d'adhésion en conditions dynamiques sur circuit-test

Sur circuit test, la configuration de tuyauterie présentant une cartographie hydrodynamique homogène (utilisation de la simulation numérique d'écoulement) permet l'implantation d'un manchon porte-coupons (Poupault P., Pierrat D. & Hermon C., 2014). Les coupons extractibles permettent de suivre l'adhésion des micro-organismes dans le temps et de caractériser leur cinétique d'encrassement. Grâce à cette même configuration – manchon avec coupons extractibles – l'aptitude à la recontamination des cellules viables cultivables survivant à une procédure de nettoyage-désinfection est mesurée pour trois souches différenciées par leur comportement bio-adhésif au laboratoire

Optimisation qualitative et environnementale des opérations d'hygiène au chai

En conditions dynamiques (circuit-test, halle technologique), l'optimisation de l'opération de rinçage (utilisation de la conductivité, de nouvelles technologies et suivi des volumes, incidence du débit) est recherchée. Elle sera validée sur site. L'étude des paramètres hydrodynamiques du flux (nature, concentration et temps de contact des formulations détergentes et désinfectantes) est étudiée sur circuit-test, d'un point de vue microbiologique (cellules résiduelles adhérentes) par utilisation de l'ATPmètrie et du manchon équipé de coupons extractibles.

Des études sont réalisées sur les conditions hydrodynamiques autorisant un rinçage efficace. En effet, lors du transfert des vins, de faibles vitesses d'écoulement sont recherchées pour des raisons qualitatives (limiter les brassages liés aux forces de cisaillement et fuites internes des pompes, limiter les dissolutions d'oxygène à l'aspiration). Dans les caves vinicoles, les rinçages à l'eau des canalisations après le transfert du vin sont réalisés avec les mêmes pompes et généralement les mêmes conditions hydrodynamiques. L'objectif des expérimentations était de démontrer que cette pratique est peu efficace, et d'apporter des références permettant d'optimiser à la fois l'efficacité des rinçages et les consommations en eau. Les expérimentations sont réalisées sur 28 mètres linéaires de canalisations souples en DN50, les transferts étant assurés par l'intermédiaire d'une pompe à impulsions équipée d'un variateur de vitesse. Les rinçages après transfert du vin sont réalisés à différentes vitesses d'écoulement (de 0,3 à 1,4 m/s) et avec différents volumes d'eau (de 1 fois à 3 fois le volume des canalisations). L'efficacité du rinçage est contrôlée par un rinçage complémentaire à l'aide d'un obus (Desseigne J-M., 2015).

Sur site, les essais sont réalisés dans un chai en région Médoc et, à trois stades de l'itinéraire technique, sur trois cuves inox 304 de 190 hL : après FML, à l'entonnage, en fin d'élevage. Après nettoyage, en plusieurs points de la cuve, des mesures d'ATP et des analyses microbiologiques (écouvillons- détermination de levures totales, levures NS - Non *Saccharomyces* - et bactéries totales) sont réalisées. Les zones retenues sont : robinet de dégustation, joint de la porte de la cuve, vanne intérieure, piquage intérieur, cheminée, paroi intérieure et plafond de la cuve. En cours de lavage des prélèvements sont réalisés et une mesure de conductivité est réalisée sur les échantillons. Les temps de lavage sont relevés ainsi que les volumes d'eau utilisés. L'objectif est de mesurer les volumes d'eau utilisés, et d'avoir un suivi de la qualité de cette eau de rinçage, par conductimètrie, pour évaluer la fin de l'étape de rinçage.

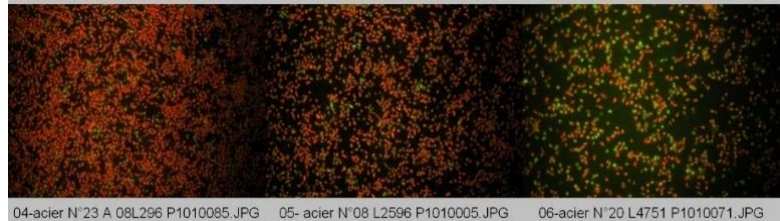
Résultats – discussion

Comportement bio-adhésif et nature des microorganismes

Les différents tests réalisés au laboratoire montrent des différences dans les caractéristiques morphologiques et physico-chimiques de 24 levures de la filière viti-vinicole. Les souches se distinguent pour leur croissance, hydrophilie, mobilité électrophorétique. Il en est de même pour les tests réalisés sur un panel de 12 souches de levures du genre *Brettanomyces*.

Pour les tests d'adhésion, quelle que soit la souche, l'adhésion la plus élevée est obtenue sur l'acier inoxydable 316 (photo 1). Sur les trois matériaux (acier 316, PolyÉthylèneTéréphtalate - PET -, verre), les niveaux de biocontamination se sont révélés soucho-dépendants. Les observations microscopiques ont mis en évidence une distribution relativement homogène des cellules adhérentes sur l'acier inoxydable et le verre et plus hétérogènes sur le PET.

Photo 1 : Adhésion sur l'acier des souches 23A, 8 et 20 (UMR INRA AgroParisTech)



Enfin, concernant les biofilms, toutes les souches ont montré une capacité à former des structures en trois dimensions (photo 2) après sédimentation au fond des puits des microplaques ; l'architecture de ces structures est soucho-dépendantes. On observe des structures éparées (après coloration), plus denses ou continues.

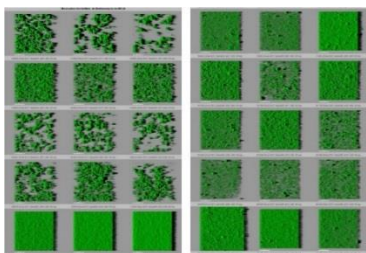


Photo 2 : Biofilms formés par 10 souches à la surface des microplaques – 3 photos par souche (UMR INRA AgroParisTech)

La biocontamination des surfaces dépend de la nature des matériaux et de celle des souches contaminantes ; ces données ont un impact sur l'efficacité des procédures d'hygiène.

Cinétique d'encrassement

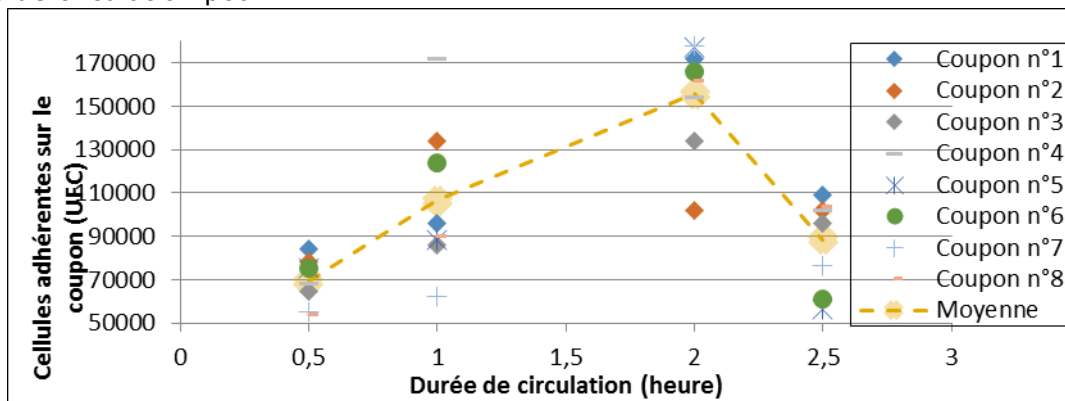
En conditions dynamiques, sur circuit-test, l'aptitude de 3 souches de levures du genre *Brettanomyces* à la bio-adhésion est confirmée sur acier inoxydable 316. La simulation numérique utilisée par les ingénieurs du CETIM – Centre Technique des Industries Mécaniques - a permis la conception puis la réalisation du manchon en acier inoxydable ; incorporé (photo 3) au circuit-test et muni de 16 coupons extractibles de 3,14 cm², il a permis de suivre dans le temps la cinétique de bio-adhésion. Les résultats confirment les observations faites au laboratoire : une bio-adhésion liée aux caractéristiques de la souche et au matériau.



Photo 3 : Manchon équipé des coupons extractibles (inox) incorporé au circuit-test (IFV)

Des informations complémentaires apparaissent. Des différences de comportement bio-adhésif sont mises en évidence sur le niveau d'encrassement (nombre de cellules vivantes adhérentes sur les coupons), pic d'adhésion (dans le temps). Les niveaux d'adhésion (exemple de la souche Br21 sur le graphique 1) sont importants.

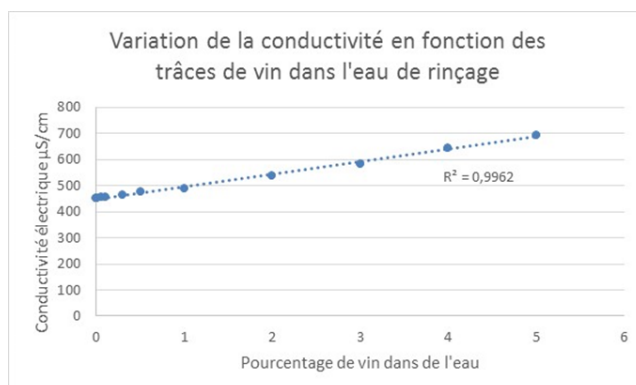
Graphique 1 : Nombre de cellules vivantes adhérentes sur les coupons PET en fonction du temps de circulation pour Br21 -IFV



L'aptitude des souches à « survivre » à une procédure de nettoyage-désinfection est évaluée, par leur capacité à recontaminer les surfaces (circuit-test) après passage d'un vin synthétique stérile. Des différences entre les trois souches apparaissent également. La classification des trois souches se retrouve entre les deux matériaux (PET et acier inoxydable). L'aptitude à l'adhésion est très sensiblement liée à la nature de la souche et ses caractéristiques morphologiques et physiologiques. Les trois souches qui adhèrent sur PET montrent une aptitude certaine, comme sur l'acier inoxydable, à résister à une procédure de nettoyage-désinfection et à recontaminer les surfaces. L'effet est moins important après procédure complète (avec démontage), comme attendu. Des différences de comportement sont observées, comme sur acier inoxydable, dans la façon dont les souches réagissent aux éléments extérieurs.

Gestion de l'eau et des paramètres hydrodynamiques

Le rinçage a pour objectif d'éliminer les traces de produit (vin) restant dans les canalisations après transfert et de réaliser un rinçage des surfaces internes des canalisations. L'optimisation de cette opération doit prendre en compte l'efficacité de l'opération (élimination des traces de vin) et les quantités d'eau consommées. Un rinçage trop important entraîne en effet des dépenses excessives en eau, alors qu'un rinçage insuffisant se traduit par des risques de développement de microorganismes. Les études ont permis d'identifier la conductivité électrique comme traceur pertinent de la qualité des eaux de rinçage (graphique 2 et tableau 1) en comparaison avec les autres indicateurs. Son utilisation peut permettre d'optimiser cette opération, permettant de la piloter à partir de critères précis et non par simple observation visuelle de la clarté de l'eau.



Graphique 2 :
variation de la
conductivité en
fonction des traces
de vin dans l'eau de
rinçage.

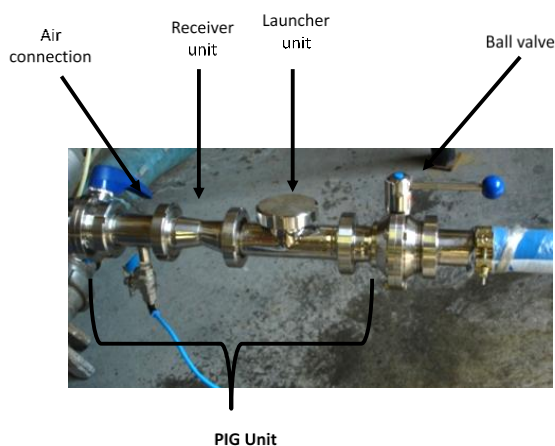


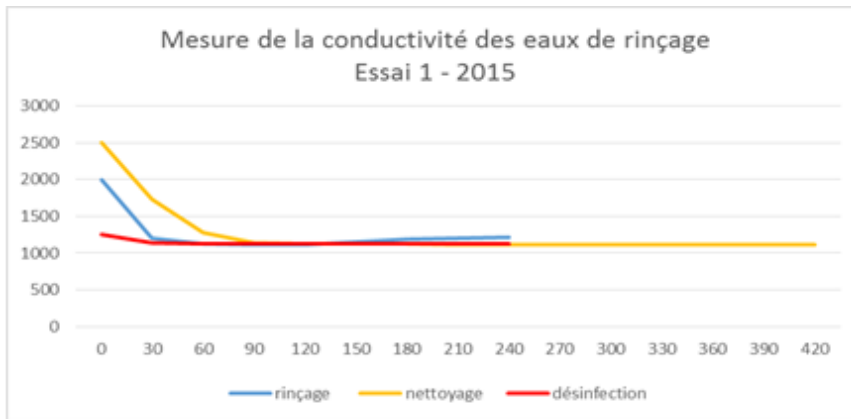
Photo 4: système de rinçage des canalisations par racleurs.

Une nouvelle procédure de rinçage par raclage des canalisations a également été expérimentée (photo 4). La progression du racleur (silicone ou éponge) permet de réaliser un rinçage complet et efficace des tuyauteries, en autorisant d'importantes réductions de consommation en eau (plus de 80 %). En fin de rinçage, les canalisations ne contiennent plus d'eau résiduelle, ce qui est favorable à l'hygiène.

Tableau 1 : Caractéristiques des eaux de rinçage en fonction de leur pollution (traces de vin)

Traces de vin en %	conductivité (µS/cm)	Turbidité NTU	A420	A 520	A280	Intensité colotante (A420+A520)
0	452	0.146	-0.0043	-0.0047	-0.0029	0.00
0,01	452	0.296	-0.0012	-0.0018	0.0047	0.00
0,05	454	0.731	0.0006	-0.0018	0.0216	0.00
0,1	456	1.22	0.0052	0.0022	0.0444	0.00
0,3	465	2.4	0.0161	0.0091	0.1256	0.02
0,5	476	3.85	0.029	0.0187	0.2094	0.04
1	489	7.32	0.0608	0.0398	0.4193	0.10
2	538	14.5	0.1078	0.0782	0.792	0.18
3	583	21.4	0.1635	0.1234	1.1745	0.28
4	644	29	0.2083	0.1561	1.6183	0.36
5	694	36	0.258	0.1943	1.9948	0.45
Vin	3670	856	3.0946	3.0239	3.4432	6.11

Les essais de rinçage sont réalisés avec la pompe à impulseurs utilisée à son débit maximal, soit 97 hl/h, ce qui correspond à des vitesses d'écoulement de 1,37m/s. Le rinçage est réalisé avec 90 litres d'eau (1,5 fois le volume intérieur des canalisations). La durée de l'opération de rinçage est de 33 secondes. A faible vitesse d'écoulement, il est démontré que le rinçage est peu efficace, des traces mesurables de vin restant dans les canalisations, même avec des volumes utilisés importants (trois fois le volume des canalisations). A l'inverse, le rinçage avec des vitesses d'écoulement élevées (1,37 m/s) est efficace, même avec de « faibles » quantités d'eau nécessaire. En synthèse, un rinçage efficace nécessite non pas des volumes d'eau importants mais des vitesses linéaires élevées (débits élevés). En pratique, les rinçages doivent donc être réalisés aux vitesses maximales des pompes et, en cas d'installations importantes, par l'intermédiaire d'une pompe annexe reliée à une réserve d'eau.



Graphique 3 : évolution de la conductivité (µs) des eaux de rinçage dans le temps (minutes) pour les 3 étapes de la procédure d'hygiène.

L'intérêt de la conductimétrie pour valider la fin des opérations de rinçage est confirmé sur site. Il semble également qu'il soit possible de pouvoir réduire sensiblement les volumes d'eau utilisés ainsi que le temps passé (au moins de 50% dans les conditions de ces deux essais et sur ce site), tout en conservant des rinçages suffisants. Les contrôles ATPmétriques, surtout au niveau des points critiques (comme le robinet de dégustation) mettent en évidence l'importance d'un démontage ou d'un dérougissage dans l'approche du nettoyage.

Tableau 2 : Volume et caractérisation environnementale des eaux pour chacune des étapes de nettoyage (cuve 2 et cuve 14) – Essais sur site.

Echantillon Essai après FML	Essai 2 cuve 2 rinçage	Essai 2 cuve 2 nettoyage	Essai 2 cuve 2 Total effluents	Essai 2 cuve 14 rinçage	Essai 2 cuve 14 nettoyage	Essai 2 cuve 14 Total effluents
Volume d'eau L	93	365	463	155	332	491
pH	3.98	9.02	6.35	4.52	8.95	7.73
MES mg/L	2830	2	717	1525	1	252
Flux MES g/hL vin	-	-	1.7	-	-	0.7
DCO mg/L	9740	37	2612	4160	36	1440
Flux DCO g/hL vin	-	-	6.4	-	-	3.7
DBO5 mg/L	2000	2	150	500	2	80

Le graphique 3 représente l'évolution de la conductivité exprimée en µS /cm sur les eaux de rinçage à la suite des différentes étapes du process : rinçage à l'eau, nettoyage (détartrage) et désinfection et pour deux cuves 2 et 14 (vin rouge après FML). Les résultats font apparaître pour les trois étapes, une diminution rapide des valeurs de conductivité pour revenir à la valeur de conductivité correspondante à l'eau du réseau. Les contrôles ATPmétriques, surtout au niveau des points critiques (comme le robinet de dégustation) mettent en évidence l'importance d'un démontage ou d'un dérougissage dans l'approche du nettoyage.

Le bilan de l'essai 2 (tableau 2) confirme l'impact environnemental des solutions de nettoyage, et des eaux de rinçage dans le contexte réglementaire. L'adaptation des paramètres pour chacune des étapes (nature, concentration) doit être raisonnée pour conduire à un volume d'effluents limités ; dans ce cadre-là, le rinçage prend une place très importante.

Conclusion

En conditions maîtrisées au laboratoire (statique) puis sur circuit-test (dynamique), l'aptitude de trois souches de levures du genre *Brettanomyces* à la bio-adhésion et à former des biofilms est confirmée. Elle est très sensiblement liée à la nature de la souche de levure et au type de matériau. Les cinétiques d'encrassement confirment l'incidence de la souche sur l'adhésion et son pic.

Les caractéristiques morphologiques et physiologiques de la souche semblent également avoir une incidence directe sur la capacité de la souche à résister à une procédure de nettoyage-désinfection, puis à recontaminer un autre vin par l'intermédiaire des surfaces.

L'opération de rinçage a pu être optimisée par l'utilisation de la conductimétrie (maîtrise des volumes) ou celle de nouvelle technologie (raclage à l'obus). La validation sur site a été réalisée à trois étapes clés. L'efficacité du rinçage dans un chai est en partie liée aux paramètres hydrodynamiques ; elle est plus pertinente avec un fort débit plutôt qu'un volume important.

Les résultats concrets obtenus pour le rinçage doivent être déclinés pour les opérations de nettoyage et désinfection, pour lesquelles une meilleure efficacité passe par l'adaptation des paramètres hydrodynamiques (nature, temps de contact, débit) avec les indicateurs et les outils d'application les plus adaptés à chacune des situations et notamment celle entre le matériau et la souillure, qu'elle soit organique, minérale ou microbienne.

Remerciements

Les auteurs remercient les partenaires suivants pour leur contribution : Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Margareth Renaud et Jean-Marie Herry (AgroParis Tech), Daniel Pierrat (CETIM), Christophe Hermon (CTCPA). Les travaux ont été conduits avec le soutien financier de FranceAgriMer.

Bibliographie

.Poupault P., Pierrat D. & Hermon C., 2014. Utilisation du circuit-test pour la modélisation des cinétiques d'encrassement lors des transferts du vin. Journée de restitution des travaux RMT Chlean, 22 mai 2014, Maison du Lait, Paris.

.Desseigne J-M., 2015. Optimisation des rinçages, cas des canalisations. Atelier-Conférence Nettoyabilité, lutte contre *Brettanomyces*, Sitevi, 24-26 novembre 2015, Bordeaux, France.

.Poupault P., 2015. Caractérisation des phénomènes de bio-adhésion à l'origine des altérations des vins, 2015. 10^{ème} Symposium International d'œnologie, 29 juin-1er juillet 2015, Bordeaux, France.

Copyright MatéVi. Toute reproduction totale ou partielle des contenus est strictement interdite. Pour pouvoir les diffuser, contactez-nous.