



Hygiène des surfaces : optimisation des procédures par une meilleure compréhension des phénomènes de bio-adhésion

P. Poupault : IFV Pôle Val de Loire - Centre - Tél : 02 47 23 45 11

pascal.poupault@vignevin.com

Mécanismes d'adhésion, altérations et procédures d'hygiène

Contexte

Le matériel, de part sa diversité, sa configuration, sa constitution (matériaux), représente, de la récolte au conditionnement final, une source de contamination en microorganismes, dont ceux d'altération. A chacune des étapes liées à l'itinéraire d'élaboration, les résultats de suivi et de bilan du niveau d'hygiène confirment la présence de microorganismes comme les levures du genre *Brettanomyces* au niveau des surfaces (joints, vannes). L'évolution des pratiques (maturité, sulfitage, filtration) favorise la survie et le développement de ces vecteurs d'altérations.

Objectifs

Les travaux mis en place dans le cadre d'un programme de recherche subventionné par FranceAgriMer ont pour but de caractériser l'aptitude des microorganismes de la filière à adhérer aux surfaces rencontrées et à former des biofilms (dépôts en trois dimensions) à l'origine des contaminations. Les outils mis en commun par l'ensemble des partenaires (plate-forme microscopique de l'unité UMR MICALIS de l'INRA-AgroParis Tech, la simulation numérique des écoulements travaillée par le Cetim, halls technologiques pour bancs d'essais) ont permis de travailler dans des conditions maîtrisées, au laboratoire et sur circuit-test en particulier.

Résultats

Suite aux résultats 2011 (différences de comportement bio-adhésif entre différentes souches de levures du genre *Brettanomyces*), le travail a consisté à l'étude du comportement d'un panel plus important de souches de levures d'altération du genre *Brettanomyces*. Ces souches sont issues des souchothèques de l'IFV et InterRhône. Les tests, réalisés en conditions standardisées au laboratoire ont pour objectif d'évaluer les caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques de ces souches. Par ailleurs, leur comportement bio-adhésif (adhésion et formation de biofilms) est étudié, à la surface de trois matériaux pouvant être utilisés dans la filière vitivinicole : le polyéthylène téréphtalate (PET), l'acier inoxydable 316 et le verre.

L'étude des cinétiques de croissance et des caractéristiques macroscopiques d'une dizaine de souches, conduisent aux observations suivantes : des souches à croissance « conventionnelle », des souches à croissance « atypique » que l'on peut attribuer à une sédimentation importante malgré l'agitation. On a pu observer deux groupes avec un même « morphotype ». Enfin, une souche se distingue de toutes les autres par des colonies rugueuses et de plus grand diamètre.

Pour ce qui est des caractérisations physico-chimiques, les tests MATS (Microbial Adhesion To Solvents) montrent une faible affinité des différents isolats pour l'ensemble des solvants

utilisés. Deux groupes des souches ont pu être identifiés, A et B. Les souches du groupe B affichent une hydrophilie de surface moins marquée que les souches du groupe A. Cette classification a été retrouvée dans les mesures de mobilité électrophorétique : les souches du groupe A, plus hydrophiles, sont également plus électronégatives que les souches du groupe B (figure 1).

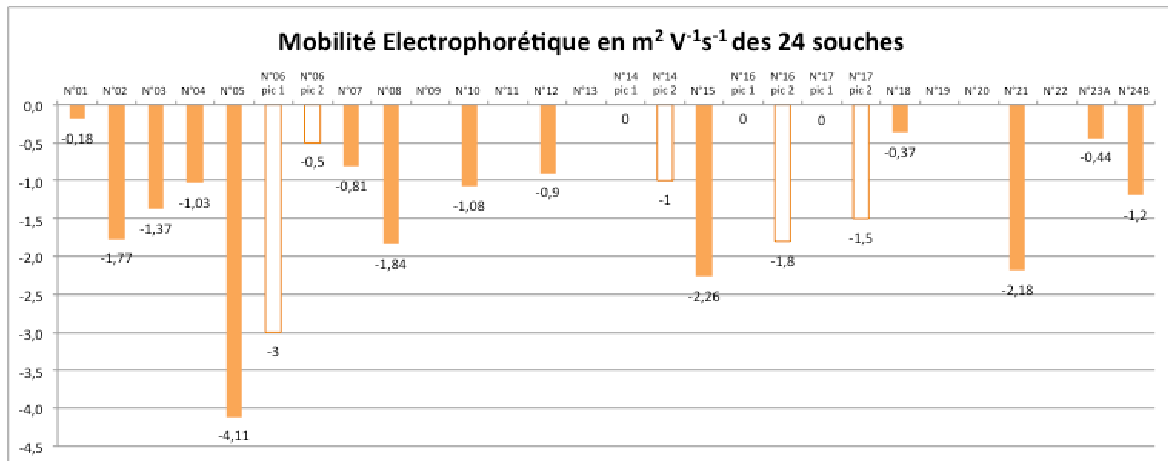
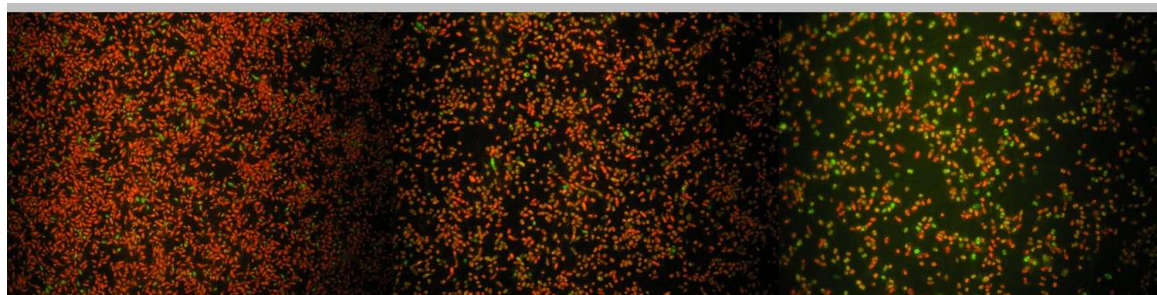


Figure 1 : Mobilité électrophorétique des souches (source : UMR MICALIS INRA-AgroParisTech).

Pour les tests d'adhésion, quelque soit la souche testée, l'adhésion la plus élevée est obtenue sur l'acier inoxydable 316. Sur PET et verre, les niveaux de biocontamination se sont révélés soucho-dépendant. Les souches du groupe A adhèrent plus faiblement que celles du groupe B. Les observations microscopiques ont mis en évidence une distribution relativement homogène des cellules adhérentes sur l'acier et le verre et plus hétérogène sur le PET. Enfin, concernant les biofilms, toutes les souches ont montré une capacité à former des structures 3D, l'architecture de ces structures est souches dépendantes et en lien avec la classification précédemment établie. On note des structures éparées (souches du groupe A) et des structures plus denses et continues (souches du groupe B). La souche Br21 affiche une différence en formant des biofilms homogènes et continus.

Des différences sont mises en évidence sur un panel plus important de souches de levures du genre *Brettanomyces*, dans les caractéristiques microbiologiques et physico-chimique (caractère hydrophobe/hydrophile et électronégativité) ainsi que dans le comportement bioadhésif. L'aptitude à former un biofilm est maximale sur l'acier inoxydable 316, mais aussi substratum et souche-dépendante pour les deux autres types de matériaux (plus faible pour les souches du groupe A) (photo 1).

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



04-acier N°23 A 08L296 P1010085.JPG 05- acier N°08 L2596 P1010005.JPG 06-acier N°20 L4751 P1010071.JPG

Photo 1 : Adhésion sur l'acier des souches 23A, 8 et 20 (source : MR MICALIS INRA-AgroParisTech).

Le deuxième axe de travail porte sur l'optimisation des procédures.

L'aptitude à l'encrassement de différents matériaux dépend de nombreux paramètres – en plus de celui abordé de la nature de la souche et du matériau – liés à la vitesse d'écoulement, la température et la constitution chimique du fluide. Les phénomènes qui résultent de ces actions chimiques, thermiques ou encore hydrodynamiques, intervenant lors de la remise en suspension de particules adhérentes restent complexes à appréhender car ils mettent en jeu de nombreuses forces peu faciles à formaliser. C'est pour essayer de modéliser ces phénomènes qu'il a été décidé de concevoir le manchon porte-échantillons. Incorporé dans le circuit-test – repris en main lors de l'année précédente - il permet d'observer des cinétiques d'encrassement dans un premier temps, de désencrassement dans un deuxième temps. Les travaux du Cetim, via la simulation numérique d'écoulement, se sont attachés à concevoir puis réaliser, via ce manchon, un dispositif susceptible de fournir un écoulement maîtrisé et régulier qui puisse être le support d'une modélisation. Ces travaux, par l'étude des frottements et écoulements liés à la configuration du circuit-test existant et qui accueillera le manchon, a conduit à la livraison du modèle définitif en acier inoxydable 316.

Les équipes de l'IFV (Tours et Nîmes) se sont associées à celle du CTCPA pour mettre en place les premiers travaux sur circuit-test équipé du manchon. Le manchon est muni de 16 coupons extractibles en acier inoxydable qui peuvent traduire l'évolution de l'encrassement pendant la circulation (en circuit fermé) d'un vin synthétique contaminé avec des levures d'altération (souche de levure du genre *Brettanomyces*). Ces travaux, après mise en place des protocoles (temps de circulation, modalité de prélèvement des coupons, composition du vin synthétique,...) ont confirmé l'aptitude de trois souches de levure du genre *Brettanomyces* (celles bien différenciées pour leur comportement bioadhésif différent d'après les travaux de l'équipe d'AgroParis Tech sur la plateforme microscopique) à adhérer sur l'acier inoxydable. Les travaux préliminaires ont permis de valider, dans des conditions maîtrisées (souillures, débit,) la possibilité de suivre ces phénomènes de bioadhésion dans le temps, de révéler les populations résiduelles (prélèvement du coupon, passage aux ultrasons pour récupérer les cellules vivantes). On a alors pu noter des évolutions différentes au cours de la circulation du liquide (jusqu'à 6 heures) pour ces trois souches. Il est apparu également que ces trois souches ont montré une aptitude à la recontamination d'un vin synthétique stérile suite à une opération de nettoyage-désinfection du circuit-test contaminé au préalable (circulation 2 heures avec du même vin synthétique contenant au moins 1 million de cellules vivantes par ml).

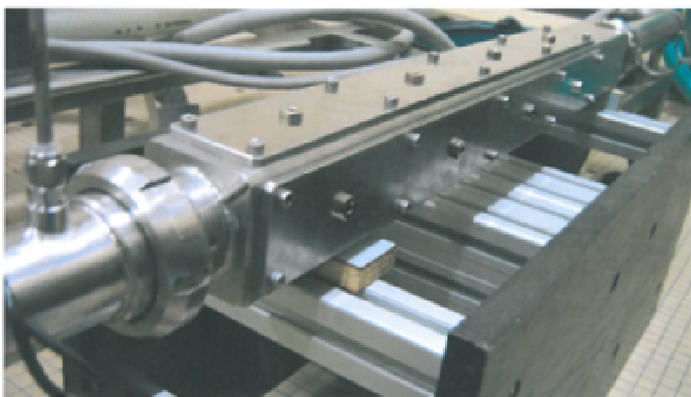


Photo 2 : manchon porte-échantillons incorporé au circuit-test (source : Pascal Poupault, IFV)

L'aptitude des souches de *Brettanomyces* à adhérer est confirmée à l'échelle du circuit-test. Suite aux résultats obtenus en statique par l'équipe d'AgroParisTech, on a pu confirmer les différences de comportement bioadhésif (cinétique d'encrassement) de trois souches, en condition dynamique cette fois-ci, grâce au travail du Cetim qui a abouti à la fourniture du manchon porte-échantillons.

L'objectif des prochains travaux est d'étudier le comportement bioadhésif de ces souches sur d'autres matériaux (PET notamment) au laboratoire comme à l'échelle pilote (circuit-test), grâce à la modélisation maintenant maîtrisée. Il faudra alors mesurer l'influence des procédures de nettoyage-désinfection (cinétique observée grâce au manchon équipé de 16 coupons) et de leurs caractéristiques (hydrodynamiques, composition chimique, température,...) sur ces phénomènes de bioadhésion pour proposer des conditions optimales sur site industriel.

Il est également prévu de pouvoir observer sur site, des cinétiques d'encrassement (opérations de transfert) ; pour cela les ingénieurs du Cetim s'attacheront à faire une simulation numérique en lien avec les configurations rencontrées.

De nouveaux en 2012 un état des lieux sur quelques chaînes de mise en bouteilles, a mis en évidence des points plus contaminés que d'autres et qui sont à l'origine des recontaminations, et dont la corrélation avec les procédures d'hygiène mises en place a été abordée et confirmée.

Un volet important a été consacré à l'étude des phénomènes de bio-adhésion sur la surface interne des contenants en bois (InterRhône).

La mise en place de nouveau de banc d'essai à apporté la confirmation que l'utilisation des ultrasons est intéressante, que l'ozone gazeux est plus efficace que l'eau ozonée, que certaines techniques (comme le chimique) n'ont pas d'effet dans le bois à court terme. Aucun procédé ne désinfecte complètement les parois internes d'une barrique contaminée ; les recontaminations sont observées quelque soit la procédure utilisée. Un gros travail est réalisé sur l'état physiologique des souches de levures d'altération (souches de levure du genre *Brettanomyces*) et particulièrement l'état VNC (Viable Non Cultivable) et l'année en cours (par une optimisation des méthodes de prélèvements et de révélations) doit permettre de confirmer les hypothèses émises sur l'incidence réelle des différents procédés sur l'état physiologique. Les résultats sont attendus et auront des conséquences sur le choix des procédures