

CAPACITE DE FLORES DE BARRIERE A LIMITER L'IMPLANTATION ET LE DEVELOPPEMENT DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Soumet Christophe¹, Ait Ahmed Azziza¹, Le Grandois Patricia¹, Rousset Nathalie²,
Travel Angélique², Hanin Aurélie³, Bridier Arnaud¹

¹Anses, Laboratoire de Fougères, Bâtiment Bioagropolis, 10B Rue Claude Bourgelat, 35133
JAVENE

²ITAVI, 7 rue du Faubourg Poissonnière, 75009 PARIS

³ACTALIA, Sécurité des Aliments, 310 rue Popielujko, 50 000 SAINT-LO

christophe.soumet@anses.fr

RÉSUMÉ

L'utilisation des produits biocides désinfectants permet de garantir la sécurité sanitaire des produits alimentaires avicoles et de préserver la santé animale via le maintien de la biosécurité au sein des couvoirs et des élevages. Ces biocides peuvent présenter, selon leur usage, des risques en particulier pour la santé des utilisateurs (toxicité cutanée, respiratoire). Pour limiter l'exposition de ces travailleurs, des méthodes complémentaires sont envisagées afin de faire évoluer les pratiques vers une utilisation moindre et optimisée des biocides désinfectants. Le projet aDAPt évalue l'une de ces méthodes basées sur les flores de barrière (*Bacillus* sp. et flores lactiques). Celles-ci sont mises en place après l'opération de nettoyage et désinfection pour prévenir le développement d'un biofilm de *Salmonella* Typhimurium, choisi ici comme modèle de pathogène de la filière avicole. L'effet de la rémanence de l'activité bactéricide de formulations biocides commerciales, a été évaluée sur l'implantation des flores de barrière sur des coupons en polyéthylène. Pour 4 des 5 formulations biocides testées, aucun effet rémanent n'est observé après un temps d'attente de 18 h entre l'étape de désinfection et l'application des flores de barrière. Puis, pour évaluer la capacité de flores de barrière à limiter l'implantation de *S. Typhimurium*, celles-ci ont été cultivées sur des coupons en polyéthylène pendant 24 h dans différentes conditions, puis *S. Typhimurium* a été ajouté pendant 24 à 48 h avant d'être quantifié. L'inhibition de *Salmonella* est effective mais dépend fortement de la concentration des flores de barrière réellement implantées. La vitesse d'inhibition semble dépendre de la formulation des flores. Ces résultats permettent d'apporter des informations utiles sur les facteurs impactant l'efficacité des flores de barrière et sur leurs modalités d'utilisation.

ABSTRACT

The use of biocidal products makes it possible to guarantee the safety of poultry food products and the maintenance of biosecurity within hatcheries and farms. These biocides may present, depending on their use, risks in particular for the health of users (skin and respiratory toxicity). To limit the exposure of these workers, additional methods are considered in order to change practices towards a less and more optimized use of biocides. The aDAPt project assess the potentiality of one of these methods based on barrier flora. These barrier flora (*Bacillus* sp. and lactic bacteria) are settled after the cleaning and disinfection operation to prevent the development of a biofilm of *Salmonella* Typhimurium, chosen here as a pathogen model for the poultry industry. The effect of the biocidal activity remanence of commercial formulations on the development of barrier flora on polyethylene coupons was evaluated. For 4 of the 5 biocidal formulations tested, no residual effect was observed after a waiting time of 18 hours between the disinfection step and the application of the barrier flora. Then, to evaluate the capacity of barrier flora to limit the colonization of *S. Typhimurium*, the barrier flora were cultivated on polyethylene coupons for 24 hours under different conditions, then *S. Typhimurium* was added for 24 to 48 hours before being quantified. Inhibition of *Salmonella* is effective but varies depending on the nature and concentration of barrier flora. These results provide useful information on the factors affecting the effectiveness of barrier flora and on their methods of use.

INTRODUCTION

Les biocides désinfectants sont utilisés pour détruire les microorganismes pathogènes et la flore

d'altération afin de garantir un niveau élevé de protection de la santé humaine, animale et de l'environnement. Pour être autorisés sur le marché, ils doivent remplir certaines exigences réglementaires en termes d'efficacité, de toxicité, d'écotoxicité (Règlement Biocides CE 528/2012). Face à des exigences sociétales et environnementales fortes pour un usage plus raisonné des produits chimiques et à une absence de développement de nouveaux produits chimiques « plus verts » par l'industrie, des méthodes complémentaires telles que l'application de flores de barrière peuvent être envisagées.

Ces flores de barrière peuvent être exploitées dans l'industrie alimentaire (ateliers de production et de transformation) mais également en élevages pour contrôler l'écologie des surfaces et ainsi limiter l'implantation d'agents pathogènes. Elles peuvent être administrées directement aux animaux sous forme de probiotiques via leur alimentation ou dans l'eau de boisson. Les flores de barrière peuvent agir de différentes façons : i) par la colonisation d'une surface cible par les bactéries dites positives empêchant ainsi les pathogènes de s'implanter, cette barrière physique créant une compétition pour l'espace et pour les ressources ; ii) par la production de composés inhibiteurs (acides organiques ou des bactériocines). Une étude a démontré une réduction de la présence de *Salmonella* Enteritidis dans les fèces de ces animaux (Knap et al., 2011) ou dans le foie et le *caecum* des poules (Hayashi et al., 2018) lorsque les animaux étaient nourris avec un régime contenant des spores de *Bacillus subtilis*. La flore de barrière peut être également appliquée par pulvérisation dans l'élevage afin d'éviter une contamination des animaux par le contact avec les surfaces. La croissance de cette flore ajoutée volontairement se fait alors sous forme de biofilm dans l'environnement direct des animaux et limite l'implantation et le développement ultérieur de biofilms pathogènes. Cette méthode complémentaire aux procédures de nettoyage et désinfection appliquées dans l'élevage pourrait permettre de réduire l'usage des biocides les plus toxiques pour l'environnement et les opérateurs, tout en luttant contre l'augmentation de la transmission de pathogènes alimentaires (*Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*). En effet, contrairement à l'action curative du biocide, le biofilm formé par la flore de barrière peut représenter une stratégie préventive, en empêchant l'implantation des pathogènes. De plus en plus de flores de barrière commerciales sont disponibles sur le marché et vendues sous différentes formes. Elles sont composées de consortia microbiens incluant majoritairement des bactéries lactiques et/ou du genre *Bacillus*. Leur utilisation tend à se développer dans la filière avicole, même si leur efficacité réelle reste mal évaluée et leur mécanisme d'action peu

compris. Ce manque de connaissances justifie la volonté des acteurs de la filière de mieux comprendre les potentialités offertes par ces produits dans le cadre du projet aDAPt.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Souches bactériennes et flores de barrières

Trois flores de barrière commerciales (F1, F2, F3) constituées de *Bacillus* sp. et de bactéries lactiques, mais de formulation différentes, ont été étudiées. Sous forme de poudre, elles sont remises en suspension dans l'eau du réseau puis dénombrées sur milieux TSAYE (gélose Trypticase-Soja supplémentée avec de l'extrait de levure).

Salmonella enterica sérotype Typhimurium ATCC14028 (*S. Typhimurium*, isolée à partir de foie de poulet) a été choisie comme modèle de bactérie pathogène de la filière avicole. Des suspensions sont préparées par 3 repiquages successifs en bouillon TSBYE (Bouillon Trypticase-Soja supplémentée avec de l'extrait de levure) avant dénombrement sur milieu TSAYE.

1.2 Biocides désinfectants

A partir d'une enquête réalisée dans le cadre du projet aDAPt sur les produits biocides désinfectants utilisés dans la filière avicole, 5 produits commerciaux représentatifs des grandes familles de produits chimiques les plus utilisées ont été sélectionnés. Ils appartiennent à la famille des ammoniums quaternaires associés à des aldéhydes (A), des chlorés (B), des peracides (C), des phénolés (D) et du monopersulfate (E).

1.3 Désinfection des coupons

Les coupons de polyéthylène (PE) (20*10*1 mm) (GoodFellow, Lille), matériau présent dans les différents maillons de la filière avicole, sont trempés pour dégraissage sous agitation dans de l'éthanol pur (30 min) puis rincés 5 fois avec de l'eau osmosée. Puis, ils sont désinfectés par trempage dans de l'éthanol 70% (5 min) puis dans l'eau osmosée (10 min) avant d'être séchés. Ils sont conservés stérilement dans une boîte de Petri avant utilisation.

1.4 Implantation des flores de barrières sur coupons

L'implantation des flores de barrière sur des coupons PE a été évaluée :

- avant traitement par le désinfectant pour caractériser leur développement et

- après traitement pour évaluer l'effet rémanent potentiel du désinfectant sur les flores de barrière. Les flores de barrière sont préparées dans de l'eau du réseau stérilisée en présence ou absence de fientes [20 g pour 100 g d'eau (pH : 5,3)] ou en TSBYE. Elles sont ensuite déposées sur les coupons PE (dépôt de 10^4 à 10^5 Unités Formant Colonies (UFC) (4 à 5 log par cm^2). Les concentrations (0,8-1%) et les temps de contact (20-30 min) appliqués pour le traitement biocide sont en accord avec les préconisations du fournisseur. Pour l'effet rémanent, les coupons traités avec le biocide sont séchés à l'air libre de 18 h à 72 h avant d'être mis en contact avec les flores de barrière. Le dénombrement des flores de barrière est réalisé sur une gélose TSAYE.

1.5 Essais d'inhibition de *S. Typhimurium* par les flores de barrière

Les flores de barrière sont déposées sur les coupons PE (~ 4 - 5 log (UFC/ cm^2)) et incubées 24 h à 48 h à 25 °C. Puis, une suspension de *S. Typhimurium* (~ 4 log (UFC/ cm^2)) mélangée avec des fientes pour simuler des conditions réelles de contamination, est ajoutée sur le coupon, lequel est incubé de nouveau 24-48 h à 25 °C. Après rinçage des coupons avec l'eau du réseau, les bactéries sont décrochées des coupons à l'aide d'ultra-sons avant d'être dénombrées. Pour évaluer l'inhibition de *Salmonella* par les flores de barrière, un dénombrement de *Salmonella* sur une gélose sélective M^c Conkey (24 h à 37°C) est réalisé en comparaison avec un coupon conditionné avec de l'eau du réseau (témoin sans flore) au lieu de la flore de barrière.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Impact de la rémanence des biocides sur les flores barrières

Le dépôt d'un inoculum de 4 à 5 log (UFC/ cm^2) pour les différentes flores de barrières F1, F2 et F3 a permis respectivement d'obtenir des niveaux de $5,13 \pm 0,46$; $4,93 \pm 0,03$ et $4,50 \pm 0,1$ log (UFC/ cm^2) sur les coupons PE après 24h dans de l'eau du réseau stérilisée, suggérant une bonne implantation des flores mais sans croissance notable (résultats non montrés).

Afin d'évaluer l'impact potentiel de résidus de biocides désinfectants sur l'implantation des flores, les coupons ont été désinfectés selon les recommandations des fournisseurs avec différentes solutions commerciales (Biocides A à E). Un temps d'attente de 18 à 72 h a été évalué entre l'étape de désinfection et l'étape d'implantation des flores comme décrit précédemment. La figure 1 regroupe les quantités de flores obtenues dans ces différentes

conditions. Les résultats révèlent qu'un temps d'attente de 18 h après désinfection permet pour 4 des 5 formulations biocides testées (A à D) d'obtenir la même quantité de flore barrière que pour des coupons traités avec de l'eau dans les mêmes conditions, et cela pour les 3 flores testées. En revanche, pour les coupons traités avec le biocide E, une nette diminution de 1,82, 1,44 et 2,49 log (UFC/ cm^2) est observée pour les flores F1, F2 et F3 respectivement. Ce résultat témoigne d'un effet rémanent de la formulation biocide E (monopersulfate) qui, 18 h après application, impacte significativement l'implantation des flores sur les coupons. Après un temps d'attente de 72 h, cette diminution significative de la quantité de flores est encore visible à des niveaux similaires suggérant que l'augmentation du temps d'attente après désinfection ne permet pas d'éliminer cet effet rémanent du biocide E (résultats non montrés). Cela suggère qu'il faut être prudent dans l'association de la flore de barrière avec le désinfectant.

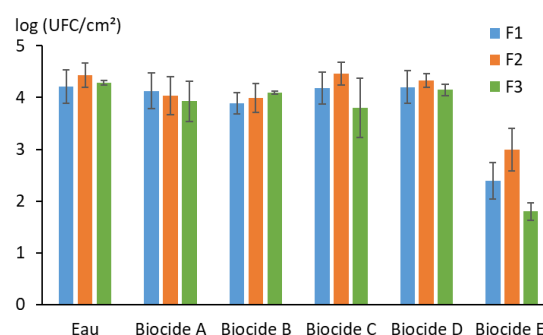


Figure 1. Impact de la désinfection sur la quantité de flores barrière (UFC/ cm^2) sur les coupons après un temps d'attente de 18 h après désinfection.

2.2 Efficacité de l'inhibition de *S. Typhimurium* par les flores de barrière

Afin d'évaluer la capacité des flores de barrière à limiter l'implantation de *Salmonella* sur les surfaces, 4 à 5 log (UFC/ cm^2) de *S. Typhimurium* ont été inoculés sur les coupons préalablement colonisés par les flores comme décrit en 2.1. La figure 2 présente les quantités de *S. Typhimurium* dénombrées en fonction des différentes flores de barrières (ou sur le témoin sans flore) à 24 ou 48 h après inoculation du pathogène.

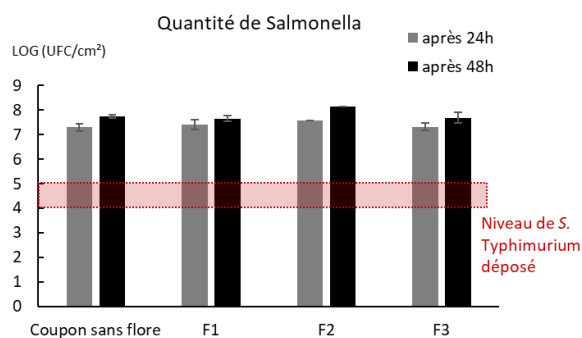


Figure 2. Quantités de *S. Typhimurium* (en log (UFC/cm²)) dénombrées 24 h ou 48 h après inoculation du pathogène sur des coupons colonisés par les flores de barrières F1, F2 et F3 développées dans l'eau du réseau en comparaison d'un coupon PE sans flore (témoin).

Les résultats montrent qu'à ces niveaux de concentrations, soit entre 4,50 et 5,13 log (UFC/cm²) (cf 2.1), les flores barrières ne permettent pas une diminution de la quantité de *S. Typhimurium* dénombrée pour les 3 flores testées en comparaison du coupon témoin sans flore. Au contraire, *S. Typhimurium* parvient à se développer pour atteindre environ 7 log (UFC/cm²) dès 24 h après inoculation, ces quantités ne variant pas significativement après 48 h.

2.3 Evaluation de l'apport de matière organique sur le développement des flores de barrière et impact sur l'inhibition de *S. Typhimurium*

Afin de tester le potentiel des flores, à des concentrations plus élevées, à inhiber l'implantation et le développement du pathogène, les conditions de culture des flores sur coupons ont été modifiées, en testant l'effet de l'apport de matière organique sur la charge par cm² de flores de barrière obtenue. Pour cela, les flores ont été cultivées soit en présence de TSBYE, soit dans l'eau du réseau supplémentée avec des fientes lyophilisées (substrat organique riche et rencontré sur le site d'élevage).

Les premiers essais montrent que le dépôt d'un inoculum de 4 log (UFC/cm²) pour les différentes flores de barrières F1, F2 et F3 a permis respectivement d'obtenir des niveaux de 7,07 ; 7,56 et 5,22 log (UFC/cm²) sur les coupons PE après 24 h en TSBYE, démontrant la capacité des flores à croître dans ces conditions, malgré des différences quantitatives en fonction des flores (résultats non montrés). En présence de fientes dans de l'eau du réseau, les niveaux de flores après 24 h étaient respectivement de 7,76 ; 4,06 et 8,00 log (UFC/cm²) pour les flores F1, F2 et F3. Ce résultat révèle une hétérogénéité de la réponse des flores dans ces conditions avec les flores F1 et F3 capables de croître fortement en présence de matière organique (fientes). Inversement, la flore

F2 demeurait à une quantité d'UFC/cm² comparable à celle de l'inoculum (environ 4 log UFC/cm²), et ne semblait pas capable de croître en présence de fientes contrairement à ce qui est observé en présence de TSBYE.

Afin d'évaluer l'effet de ces différents niveaux de flores sur la capacité d'inhibition de *S. Typhimurium*, 4 à 5 log (UFC/cm²) du pathogène ont été inoculés sur les coupons PE préalablement colonisés par les flores en présence de fientes. La figure 3 présente les quantités de *S. Typhimurium* dénombrées 24 h ou 48 h après inoculation du pathogène. Les résultats montrent une disparité de l'efficacité des flores à inhiber l'implantation du pathogène, qui est en partie dépendante des niveaux en UFC/cm² de flores de barrière. Les flores F1 et F3 (7 à 8 log (UFC/cm²)) sont capables d'inhiber significativement *S. Typhimurium*. La flore F1 démontre une efficacité totale dès 24 h alors que des niveaux d'inhibition comparables sont atteints en 48 h par la flore F3. Les coupons avec la flore F2, en revanche, présentent des quantités de *S. Typhimurium* comparables à celles dénombrées sur les coupons sans flore.

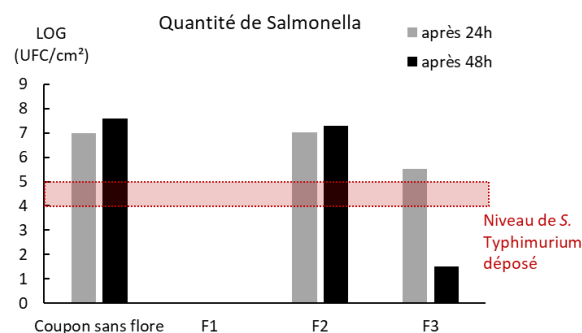


Figure 3. Quantités de *S. Typhimurium* (en log (UFC/cm²)) dénombrées 24 h ou 48 h après inoculation du pathogène sur des coupons colonisés par les flores de barrières F1, F2 et F3 développées en présence de fientes, en comparaison d'un coupon PE sans flore (témoin).

Cela est à mettre en relation avec les faibles niveaux de flores F2 obtenus dans ces conditions en présence de fientes (~4 Log (UFC/cm²)), similaires à ceux obtenus sans apport de matières organiques dans l'eau du réseau (cf 2.1).

CONCLUSION

Des résultats prometteurs ont été obtenus avec les flores de barrières car celles-ci, dans des conditions favorables à leur développement, limitent très significativement la formation de biofilms de *S. Typhimurium*. Un faible impact de la désinfection sur le développement des flores de barrière, pour la majorité des produits biocides de différentes familles chimiques, a été démontré dans le cadre de ces expérimentations de laboratoire simulant des

conditions pratiques, à l'exception du biocide E. Dans ce dernier cas, un rinçage préalable après désinfection et avant application des flores de barrière est fortement recommandé lorsque ce type de substance active est utilisée. De plus, les résultats montrent que la quantité de flores de barrière doit être suffisante (~6-7 log UFC par cm²) pour réduire efficacement la colonisation des surfaces par *Salmonella*. La présence de matière organique dans les environnements d'élevage peut également impacter le développement des flores barrières de manière spécifique en fonction du produit utilisé, ce qui souligne l'importance de maîtriser les étapes de nettoyage au préalable. Ces éléments permettent d'éclairer les acteurs de la filière sur les facteurs majeurs modulant l'efficacité

des flores de barrière et pourront être évalués par des études sur le terrain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Knap I. et al., 2011. Poult Sci (90), 1690–1694.
Hayashi R.M. et al., 2018. Front Vet Sci (5), 13.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le CAS DAR, le CIPC, la FIA, le CNADEV et le CIFOG (projet 2019-2022 aDAPt) et a été réalisée dans le cadre de l'UMT Sanivol. Les auteurs remercient l'ensemble des entreprises ayant participé à cette étude.