

ETUDE DE LA CAPACITE DES DETERGENTS ENZYMATIQUES A LUTTER CONTRE LES BIOFILMS D'*ESCHERICHIA COLI*

Hanin Aurélie¹, Levert Delphine¹, Soumet Christophe², Bridier Arnaud², Rousset
Nathalie³, Travel Angélique³

¹ACTALIA, Sécurité des Aliments, 310 rue Popielujko, 50 000 SAINT-LO

²ANSES, Laboratoire de Fougères, Bâtiment Bioagropolis, 10B Rue Claude Bourgelat, 35133
JAVENE

³ITAVI, 7 rue du Faubourg Poissonnière, 75009 PARIS
a.hanin@actalia.eu

RÉSUMÉ

La décontamination est une étape primordiale pour la sécurité sanitaire des produits alimentaires avicoles et le maintien de la biosécurité au sein des couvoirs et des élevages. Elle s'appuie sur l'utilisation de produits biocides désinfectants qui peuvent, pour la plupart, présenter des risques pour la santé des utilisateurs, l'environnement et/ou le matériel. Pour limiter leur usage, et donc l'exposition des travailleurs, des méthodes complémentaires peuvent être envisagées pour utiliser mieux et moins ces intrants chimiques. Le projet aDAPt comprend une étape dédiée à l'évaluation de procédés alternatifs ou complémentaires à l'utilisation de désinfectants, parmi lesquels les détergents enzymatiques qui ont fait l'objet des travaux décrits ici. Le rôle des enzymes est de dégrader les souillures organiques pour faciliter l'action du détergent, déstructurer les biofilms bactériens et ainsi améliorer l'efficacité de la désinfection. La capacité de 4 détergents enzymatiques commerciaux à déstabiliser des biofilms d'*Escherichia coli* a été évaluée en présence d'une souillure organique représentative des élevages de poulet de chair. L'efficacité de ces produits a été mesurée en laboratoire en fonction de l'action mécanique appliquée (avec ou sans agitation), du matériau à nettoyer (coupons en polyéthylène ou acier inoxydable) et de la température d'application (10, 20 et 30°C). Les résultats obtenus montrent que les détergents enzymatiques peuvent, dans les conditions les plus favorables (20°C, sur acier inoxydable et avec agitation) réduire de 2,6 log la concentration en *E. coli* à la surface des coupons par rapport à une simple détergence à l'eau et améliorer l'efficacité du procédé de nettoyage et désinfection dans son ensemble. Ces résultats apportent aux acteurs des filières accoupage, élevage et abattoirs, un éclairage objectif sur l'intérêt des détergents enzymatiques pour dégrader les biofilms et permettent d'optimiser leurs conditions d'utilisation.

ABSTRACT

Ability of enzymatic detergents to help controlling *Escherichia coli* biofilms

Disinfection is a key component to ensure safety of avian food products and maintain biosecurity in hatcheries and poultry farming. It relies on the use of disinfecting biocide products, most of them with harmful consequences on the health of users, on the environment and/or on equipment. To reduce their use and consequently their impact on users' health, complementary approaches can be explored for a better and reduced use of these chemical inputs. One of the project aDAPt's goals is to assess some relevant substitutes or add-ons to conventional cleaning & disinfection protocols. The efficacy of the use of an enzymatic cleaning was then investigated. The ability of 4 commercially available formulations to alter *Escherichia coli* biofilms was tested in presence of reconstituted chicken droppings. Susceptibility of biofilms to the enzyme-based detergents was measured in laboratory conditions, varying the following parameters: application of a moderate mechanical force, material to be cleaned (stainless steel or polyethylene coupons) and temperature (10, 20 and 30°C). In favorable conditions (on stainless steel, at 20°C with a mechanical action), the enzymatic cleaning achieved a 2.6 log reduction in the *E. coli* concentration on the coupons' surface compared to a cleaning with water and significantly improved the overall efficacy of the cleaning and disinfection process. These results demonstrate to the avian sector stakeholders that enzyme-based detergents can be a good option to increase the efficacy and optimize their cleaning and disinfection protocols.

INTRODUCTION

L'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection est essentielle pour garantir et renforcer la maîtrise sanitaire et contrôler la circulation des agents pathogènes dans la filière avicole. Or, l'utilisation en grande quantité de biocides de type désinfectant pour la décontamination des infrastructures et du matériel peut présenter des risques pour la santé humaine, la santé animale et pour l'environnement. L'optimisation des protocoles de nettoyage et désinfection constitue donc un enjeu majeur pour la filière. La présence de souillure organique et l'organisation des microorganismes en biofilms nécessitent l'application régulière des biocides à des concentrations importantes.

Les biofilms sont des communautés de microorganismes adhérant sur des surfaces et produisant une matrice extracellulaire qui joue un rôle protecteur vis-à-vis des agressions physico-chimiques (Bridier *et al.*, 2011). Les bactéries organisées en biofilm sont 100 à 1000 fois plus résistantes aux désinfectants qu'une cellule planctonique ou simplement adhérente sur une surface (Otter *et al.*, 2015). Différents travaux à visée médicale ou agroalimentaire ont montré que l'utilisation de détergents enzymatiques permettait d'éliminer en partie les biofilms lors de la phase de nettoyage et de les fragiliser pour l'étape de désinfection subséquente (Delhalle *et al.*, 2020 ; Fagerlund *et al.*, 2020 ; Ren *et al.*, 2013 ; Ripolles-Avila *et al.*, 2020 ; Tsiaprazi-Stamou *et al.*, 2019).

Les détergents enzymatiques sont associés à la chimie verte car leur pH est neutre et ils sont constitués de composés naturels, biodégradables et de faible toxicité (Tsiaprazi-Stamou *et al.*, 2019). Ils contiennent généralement des tensioactifs et un mélange d'enzymes dont l'activité cible la matrice extracellulaire des biofilms : protéases, lipases, amylases mais aussi cellulases, polysaccharides dépolymérasés, alginate lyases, dispersines et DNases (Bridier *et al.*, 2015). Même si ces nouvelles formulations détergentes sont de plus en plus utilisées, avec succès, en industrie agroalimentaire (surfaces ouvertes ou fermées), leur efficacité dans un contexte d'élevage avicole restait à démontrer.

Dans le cadre du projet aDAPt, les acteurs de la filière ont donc souhaité évaluer l'impact positif que pourrait avoir l'utilisation des détergents enzymatiques sur l'efficacité globale des protocoles de nettoyage et désinfection appliqués en aviculture. Le modèle bactérien choisi pour cette étude est *Escherichia coli*. Cette bactérie est responsable de colibacilloses provoquant la mort prématurée des poulets de chair et de lourdes pertes économiques pour la filière (Apostolakos *et al.*, 2021 ; Kemmett *et al.*, 2014).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Souche bactérienne

La souche *E. coli* DSM682, largement utilisée pour valider l'efficacité des désinfectants, a été sélectionnée afin d'établir des biofilms et évaluer l'impact des détergents enzymatiques. Cette souche est cultivée en bouillon TSBYE (Bouillon trypticase – soja supplémenté en extrait de levure) et dénombrée sur milieu gélosé TSAYE (TSBYE supplémenté en agar).

1.2. Désinfection des coupons

Les coupons (20 x 10 x 1 mm) en acier inoxydable 304L (EML, La Hague) et en polyéthylène (GoodFellow, Lille), matériaux présents dans les différents maillons de la filière avicole, sont dégraissés dans de l'éthanol absolu pur pendant 30 min puis rincés 5 fois dans 50 ml d'eau osmosée stérile. Ils sont ensuite désinfectés dans de l'éthanol à 70% pendant 5 min et rincés dans l'eau osmosée stérile pendant 10 min. Toutes ces étapes sont réalisées sous agitation. Les coupons sont ensuite séchés et conservés stérilement jusqu'à utilisation.

1.3. Préparation des biofilms

Des fientes de poulet sont reconstituées en hydratant 20 g de lyophilisat avec 100 g d'eau distillée stérile [pH = 5,96] puis stérilisées à 121°C pendant 15 minutes. Quarante microlitres de fientes réhydratées sont déposés sur les coupons. Après une heure d'incubation à 25°C, 40 µl d'une solution d'*E. coli* calibrée à 1x10⁸ UFC/ml est ajoutée sur le coupon (des essais préliminaires ont permis de définir le niveau de dilution nécessaire pour obtenir une concentration de 1x10⁸ UFC/ml environ à partir d'une préculture de 16 heures en TSBYE). Les coupons sont ensuite placés dans des boîtes de Petri stériles dans une étuve à 25°C pendant 5 jours en condition humide. Avant analyse ou traitement, les biofilms sont rincés à deux reprises avec de l'eau physiologique puis placés dans des tubes en verre contenant 10 ml d'eau physiologique stérile. Les cellules bactériennes adhérentes sont décrochées des supports à l'aide d'ultrasons à 35 kHz pendant 2 min (Sonicateur Elma S120H Elmasonic) avant d'être dénombrées par ensemencement d'une série de dilutions décimales en surface de géloses TSAYE.

1.4. Détergents enzymatiques

Sur la base d'une enquête menée auprès des professionnels de la filière avicole, de fournisseurs et de vétérinaires, 4 produits commerciaux qualifiés de détergents enzymatiques ont été sélectionnés. D'après leurs fiches techniques, tous ces détergents contiennent des tensio-actifs additionnés de 2 ou 3

types d'enzymes (amylases et protéases pour le produit D ; amylases, protéases et lipases pour les produits A, B et C). En guise de contrôle, de l'eau du réseau a été utilisée comme détergent témoin.

Les détergents ont été appliqués sur les biofilms préalablement séchés à 37°C pendant 1 heure. Cette étape de séchage entraîne une réduction logarithmique de l'ordre de 0,5 log de la population de *E. coli* sur le support (données non montrées). Les coupons sont recouverts de détergent à la concentration d'emploi. Les coupons sont ensuite prélevés et rincés 2 fois dans de l'eau du réseau urbain stérile.

Les produits ont été utilisés avec les concentrations et temps de contact indiqués dans la fiche technique du fournisseur. Tous les détergents enzymatiques ont ainsi été utilisés à 2% après dilution dans de l'eau du réseau stérile. Le temps de contact est de 20 minutes pour le détergent B contre 30 minutes pour les produits A, C et D.

Pour évaluer l'impact de la température d'application, l'eau du réseau stérile utilisée pour la dilution des produits a été préalablement chauffée ou refroidie à 10, 20 ou 30°C avant dilution et application sur les biofilms. Le traitement a ensuite été réalisé dans une enceinte à la température souhaitée.

Quand une action mécanique a été appliquée, les coupons ont été placés sur un agitateur orbital à 165 rpm pendant le traitement.

1.5. Application du désinfectant

Un désinfectant à base d'ammonium quaternaire et de glutaraldéhyde largement utilisé dans la filière avicole a été appliqué sur les biofilms résiduels en aval du traitement détergent. Le désinfectant a été utilisé à une concentration sublétales (dose d'emploi divisée par 5) pour que l'effet synergique d'un détergent enzymatique dans un protocole combinant détergence et désinfection puisse être quantifié.

1.6. Analyse statistique des résultats

Chaque modalité expérimentale a été répétée au moins 3 fois. Les résultats présentés sont les moyennes des différents réplicas et leurs écarts-types calculés dans des feuilles de calcul Excel. Le test de Kruskal-Wallis a été appliqué avec l'aide du logiciel XLSTAT pour déterminer la significativité des différences entre les moyennes, avec un niveau de signification alpha de 0,05.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Impact de l'application d'une action mécanique sur la mesure de l'efficacité des détergents enzymatiques sur acier inoxydable

La suspension bactérienne obtenue après décrochage des biofilms d'*E. coli* est concentrée à hauteur de $7,5 \pm 0,1$ log UFC/ml. La densité des biofilms sur les coupons en acier inoxydable après 5 jours d'incubation à 25°C atteint donc $8,5 \pm 0,1$ log UFC/support en moyenne. Ces biofilms d'*E. coli* préparés en présence de fientes de poulet ont ensuite été soumis aux différents détergents enzymatiques.

Dans un premier temps, les détergents enzymatiques ont été appliqués par simple immersion des biofilms dans le produit (fig. 1). En l'absence d'action mécanique, l'impact mesurable des détergents enzymatiques sur les biofilms, en comparaison à un traitement à l'eau, est faible. A 20°C, seul le détergent A présente une activité significative avec une densité de biofilm réduite d'1 log en moyenne par rapport au témoin « eau » ($p < 0,05$). A 30°C, seul le traitement avec le détergent C permet de réduire significativement la densité du biofilm par rapport au témoin ($-2,75$ log ; $p < 0,05$).

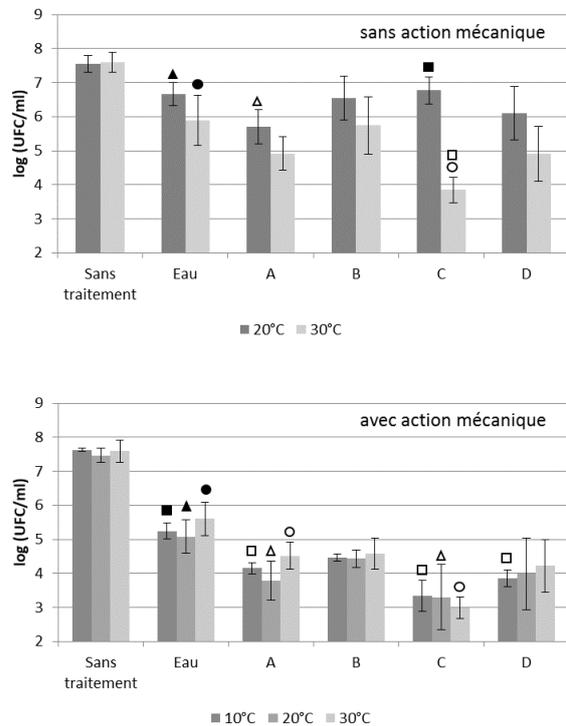


Figure 1. Impact de la détergence enzymatique sur la quantité de bactéries résiduelles (log UFC/ml) sur les coupons en acier inoxydable après traitement à différentes températures avec application ou non d'une action mécanique. La présence de symboles identiques montre qu'il existe une différence significative entre le traitement (symbole ouvert) et la condition témoin (symbole plein)(test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

L'absence d'action mécanique pendant ou après l'application des détergents peut avoir un effet sur la mesure de l'efficacité des enzymes. Ceci s'est vérifié lorsque les traitements ont été réalisés sous agitation lente. Dans ces conditions, la simple application d'eau affecte fortement la structure des biofilms avec une réduction de la concentration en *E. coli* résiduelle supérieure à 2 log (fig. 1). Néanmoins, l'activité des détergents enzymatiques est plus facilement mise en évidence dans ces conditions puisque les détergents A et C se montrent tous deux efficaces comparativement au témoin ($p < 0.05$) quelles que soient les températures d'application (-1 à -1,3 log de réduction pour A ; -1,7 à -2,6 log pour C). Le détergent D est également efficace à 10°C avec un biofilm résiduel réduit de 1,5 log en moyenne par rapport au traitement avec de l'eau ($p < 0.05$).

Les fournisseurs recommandent en général l'application des détergents enzymatiques avec un canon ou une centrale à mousse. A la fin du temps de contact, les surfaces peuvent être rincées avec un nettoyeur haute pression. Les résultats décrits ici semblent montrer que cette étape de rinçage à haute pression peut être déterminante pour une efficacité optimale des détergents enzymatiques. En effet, une simple application en conditions statiques réduit significativement l'impact de la détergence sur le biofilm.

2.2. Impact de la température sur l'efficacité des détergents enzymatiques

En conditions statiques, l'efficacité du produit C est largement augmentée à 30°C par rapport à 20°C ($p < 0.05$). En revanche, aucune différence significative d'efficacité n'a pu être observée pour les détergents enzymatiques à 10, 20 et 30°C lorsque les produits sont appliqués sous agitation (fig. 1). Selon nos résultats, l'étape de rinçage sous pression a donc un impact plus important que la température d'application du détergent enzymatique.

2.3. Impact du matériau support des biofilms sur l'efficacité des détergents enzymatiques

L'acier inoxydable n'étant pas le seul matériau présent dans les différents maillons de la filière avicole, des essais complémentaires ont été réalisés, à 20°C, avec des supports en polyéthylène (PE) (fig. 2). La densité des biofilms obtenus sur PE est comparable à celle mesurée sur l'acier ($8,5 \pm 0,1$ log UFC/support en moyenne).

Sur polyéthylène, en condition statique, l'utilisation des produits commerciaux n'a pas d'effet additionnel par rapport à l'eau. Avec agitation, le détergent A permet de réduire la densité du biofilm de 0,8 log. Cet effet est statistiquement significatif ($p < 0.05$) mais reste très modéré. Pour le détergent C, une réduction

de plus d'1 log est observée en moyenne mais la variabilité entre répliques d'un même essai et entre les différents essais ne permet pas de conclure sur la significativité statistique de cet effet.

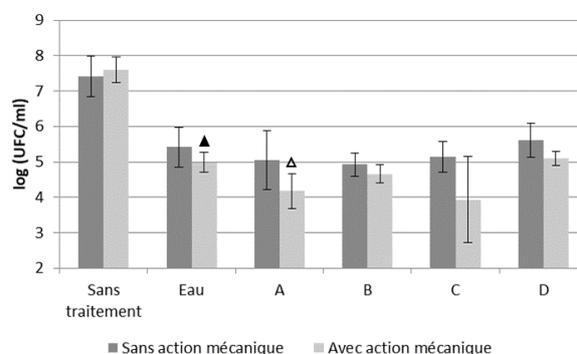


Figure 2. Impact de la détergence enzymatique à 20°C sur la quantité de bactéries résiduelles (log UFC/ml) sur les coupons en polyéthylène après traitement avec application ou non d'une action mécanique. La présence de symboles identiques montre qu'il existe une différence significative entre le traitement (symbole ouvert) et la condition témoin (symbole plein) (test de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Ainsi, l'efficacité des détergents enzymatiques comparativement à un traitement simple avec de l'eau reste très modérée sur des biofilms d'*E. coli* établis sur des supports en polyéthylène. Les résultats obtenus avec l'eau qui, même en l'absence d'action mécanique, a un impact important sur la quantité d'*E. coli* résiduelle, suggèrent que les biofilms produits sur PE ont une structure plus fragile, plus sensible à la détergence, ou sont moins adhérents aux supports. Dans ces conditions, l'effet des enzymes pourrait être effectivement moindre ou masqué. Sur le terrain, les surfaces subissent des agressions chimiques et mécaniques régulières pouvant altérer les matériaux, et notamment le polyéthylène. Il pourrait donc être intéressant de tester à nouveau l'action des détergents enzymatiques sur des matériaux vieilliss artificiellement favorisant l'adhésion des microorganismes.

2.4. Apport de la détergence enzymatique lors d'un traitement combinant détergence et désinfection

Les détergents enzymatiques agissent en permettant l'élimination des biofilms mais pourraient aussi fragiliser le biofilm résiduel, augmentant ainsi l'efficacité de la désinfection. Cet effet synergique entre détergence enzymatique et traitement avec le biocide a été apprécié en appliquant sur les biofilms d'*E. coli* une détergence avec le produit commercial C (le plus efficace en moyenne dans les essais précédents) suivie d'une désinfection modérée (tableau 1).

Tableau 1. Concentration en *E. coli* résiduelle (log UFC/ml) mesurée après application de traitements à 20°C sur les coupons en acier inoxydable, combinant détergence (eau ou enzymes, avec ou sans action mécanique) et désinfection.

Modalité	Dét. Enz.	Action méca.	Biocide	[<i>E. coli</i>] en log UFC/ml
1	Non	-	Non	7,9 ± 0,1
2	Eau	Oui	Non	6,3 ± 0,2
3	Eau	Oui	Oui	5,1 ± 0,3
4	Dét. C	Oui	Non	4,1 ± 0,3
5	Dét. C	Oui	Oui	2,9 ± 0,1
6	Dét. C	Non	Non	4,4 ± 0,2
7	Dét. C	Non	Oui	3,8 ± 0,2

Ces derniers résultats confirment l'intérêt de l'action mécanique sur l'efficacité de la détergence enzymatique (-0,3 log de biofilm résiduel sous agitation) et l'intérêt de l'utilisation d'enzymes comparativement à un simple nettoyage à l'eau (-2,2 log de biofilm résiduel). Cet effet du traitement enzymatique est également visible lorsqu'il est suivi de l'application d'un biocide à base d'ammoniums quaternaires et de glutaraldéhyde. En effet, la concentration en *E. coli* résiduelle après application des enzymes puis du désinfectant est de 3,9 log UFC/support contre 6,1 log UFC/support lorsque de l'eau est utilisée en détergence. Cependant, il est intéressant de noter que l'application du biocide entraîne une réduction décimale de 1,2 log de la concentration en *E. coli*, qu'un détergent enzymatique ait été utilisé ou non en amont de la désinfection. Ces résultats n'ont donc pas permis de mettre en évidence de « sensibilisation » du biofilm au traitement désinfectant après application du détergent C. Dans les conditions d'essai décrites ici, la meilleure efficacité d'un traitement « détergent enzymatique + biocide », comparativement au protocole « nettoyage à l'eau + biocide », réside dans l'élimination d'une plus grande partie du biofilm lors de la phase de détergence mais ne résulte pas d'une synergie entre l'action des enzymes et la désinfection. Un simple effet cumulatif entre les deux étapes du protocole de nettoyage et désinfection a été observé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Apostolakos *et al.*, 2021. *Front. Vet. Sci.* 2021 Sep (8):737720
 Bridier *et al.*, 2011. *Biofouling*. 2011 Sep;27 (9):1017-1032.
 Bridier *et al.*, 2015. *Food Microbiol.* 2015 Feb;45 (Pt B):167-78.
 Delhalle *et al.*, 2020. *Front Microbiol.* 2020;11: 1827.
 Fagerlund *et al.*, 2020. *Molecules.* 2020 Feb 12;25 (4):792.
 Kemmett *et al.*, 2014. *Avian Pathology.* 2014 : (43):1, 37-42.
 Ren *et al.*, 2013. *Am J Infect Control.* 2013 Sep;41 (9):e89-92.
 Ripolles-Avila *et al.*, 2020. *Int J Food Microbiol.* 2020 Jun 16;323:108595.
 Tsiaprazi-Stamou *et al.* 2019. *Biofouling.* 2019 Sep;35 (8):883-899.

CONCLUSION

Les travaux décrits dans cet article démontrent l'intérêt des détergents enzymatiques pour l'amélioration de l'efficacité des procédures de nettoyage et désinfection dans la filière avicole. En effet, un gain significatif a pu être observé, pour deux des quatre produits commerciaux testés, lorsque des enzymes (amylases, protéases et lipases) sont utilisées comparativement à un traitement avec de l'eau. L'application d'une force mécanique permet d'améliorer l'efficacité des détergents enzymatiques. Ainsi le rinçage à haute pression après utilisation des enzymes, comme recommandé par la majorité des fournisseurs, permettra très probablement d'obtenir des résultats intéressants, quelle que soit la température à laquelle doit être appliqué le détergent enzymatique.

Ces résultats prometteurs obtenus sur des biofilms d'*E. coli* établis sur des coupons en acier inoxydable devront néanmoins être confirmés sur des biofilms pluri-espèces et sur d'autres matériaux comme, par exemple, des supports en PE non neufs et donc potentiellement plus adhérents.

De plus, même si ces essais ont été réalisés en prenant en compte les spécificités de la filière (croissance du biofilm en présence de fientes de poulet, choix de températures d'application réalistes...), l'intérêt des détergents enzymatiques ne pourra être clairement confirmé qu'après la réalisation d'études croisées sur les modes d'application et sur le terrain.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le CASDAR, 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.

