

# CAUSERIE FROMAGÈRE

CEFR



**18 avril 2023**

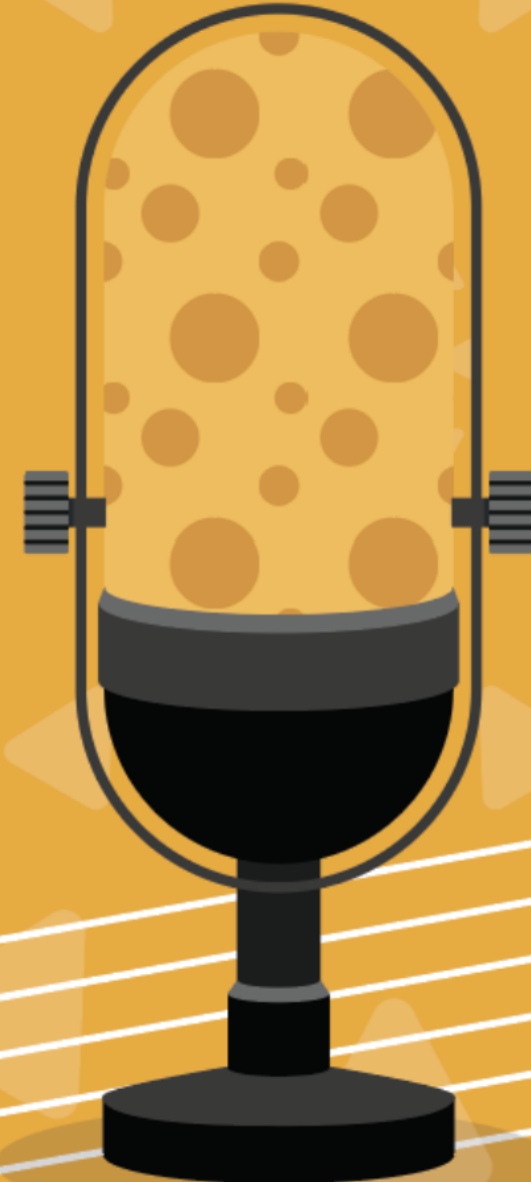
De 14h00-15h30

**Les biofilms laitiers, ces communautés microbiennes bien présentes dans les fromageries**

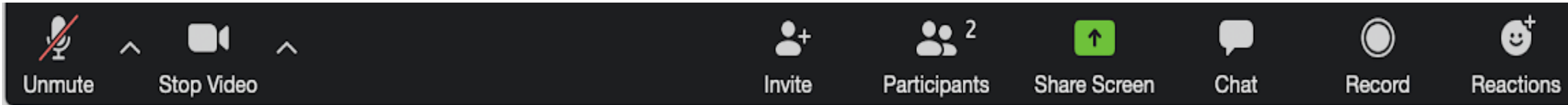
Julie Jean, professeure titulaire

Ménilie Gagnon, stagiaire post-doctorale (recherche)

Sciences agriculture et alimentation - Dép. sciences des aliments  
Université Laval



# CONSIGNES



Fermer votre micro en cours de diffusion  
Votre caméra peut demeurer ouverte

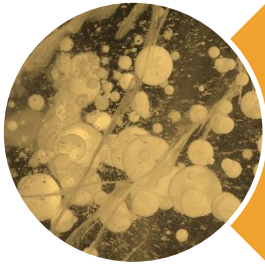


Clavarder ICI



Lever la main ICI

# Plan de présentation



Qu'est-ce qu'un biofilm?



Comment étudier les biofilms?



Que sait-on des biofilms en production et transformation laitière?

# Nos projets



Contribution à l'étude des biofilms dans l'industrie laitière : caractérisation et stratégies de contrôle



Consortium RITA  
Recherche. Innovation. Transformation. Alimentaire.



Agriculture and  
Agri-Food Canada

Contrôle des biofilms : solutions innovantes pour réduire les contaminations et optimiser le nettoyage

# Nos projets

Laboratoire de  
génomique microbienne  
DENIS ROY

Présence et impact des biofilms microbiens sur la  
qualité du lait, de la ferme à la fromagerie



**Novalait**



**Canada**



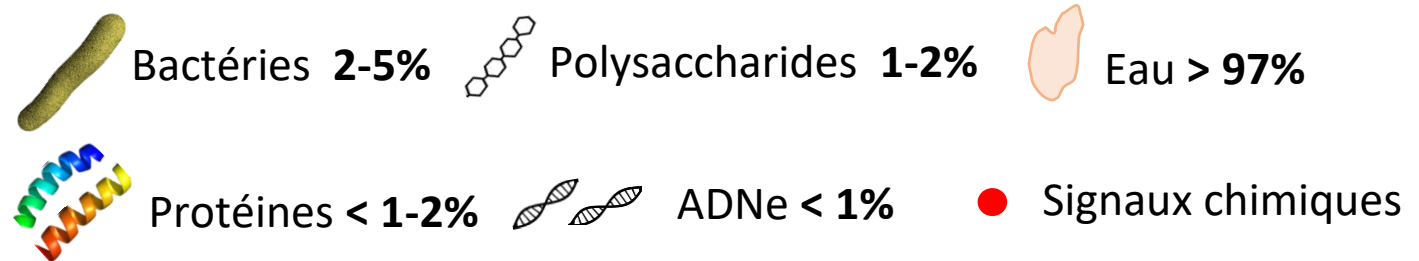
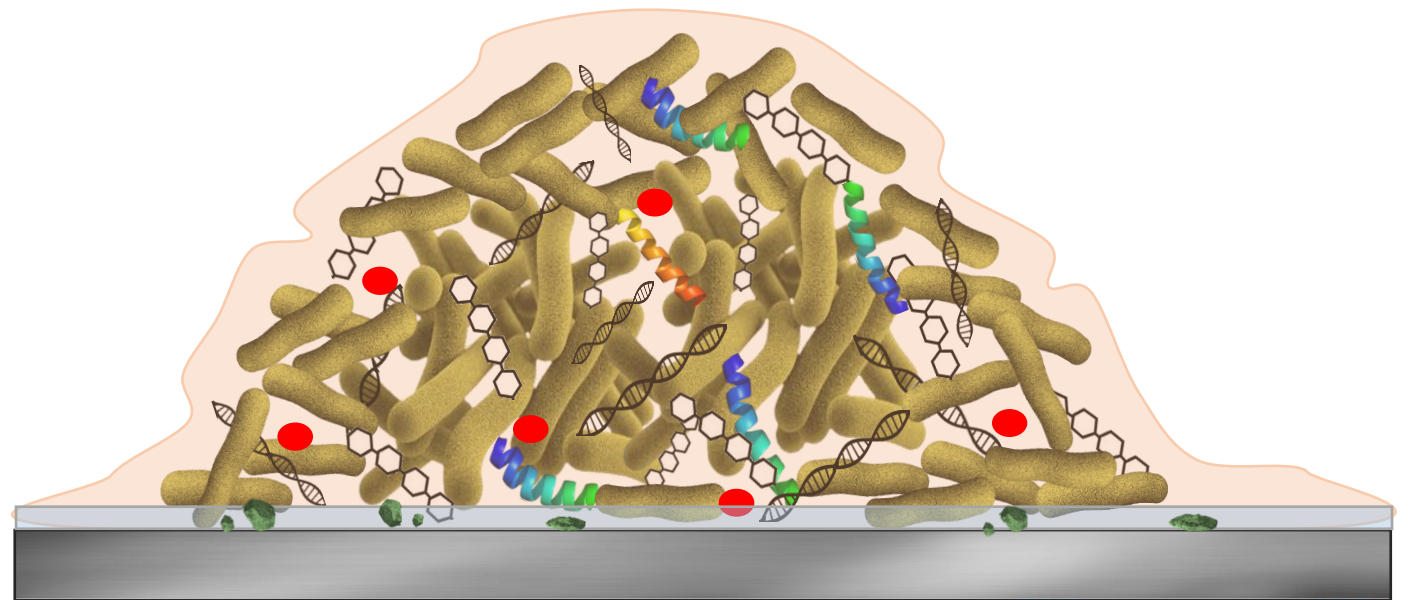
Saviez-vous que?

Plus de 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme de biofilms

# Concept général

## Biofilm:

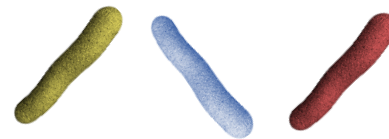
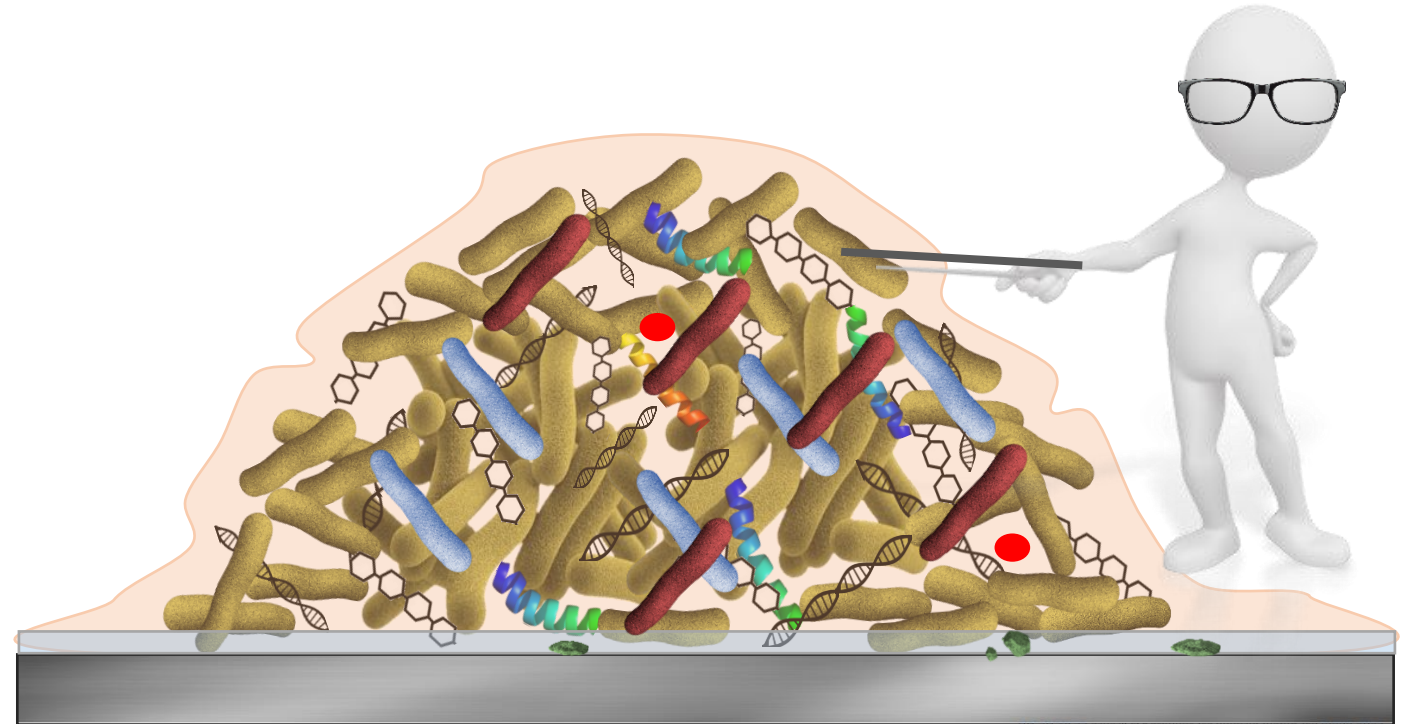
- **Communauté** structurée de microorganismes qui s'enferment dans une **matrice auto-produite** attaché à une surface
- L'étude des biofilms est principalement concentrée sur les bactéries



Adapté de Dietrich (2016) par Nissa Niboucha

# Concept général

- **Biofilm mono-espèce**
- **Biofilm multi-espèce**
  - **Coopération et avantage**
  - **Compétition**

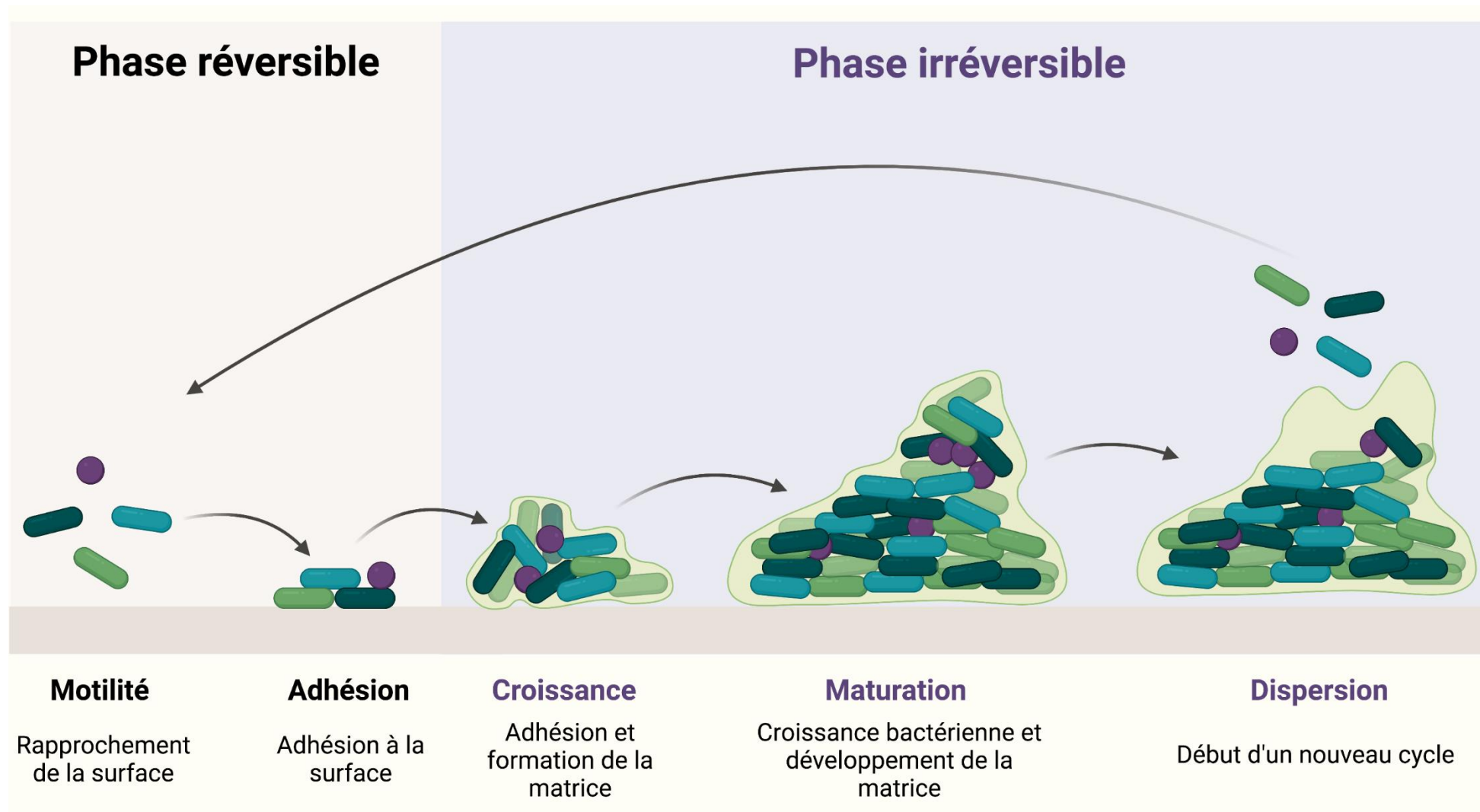


Différentes bactéries

Adapté de Dietrich (2016) par Nissa Niboucha



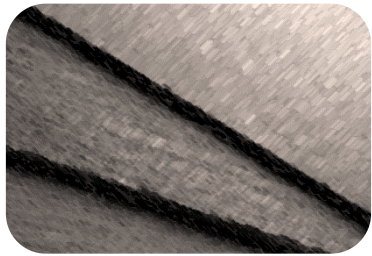
# Concept général



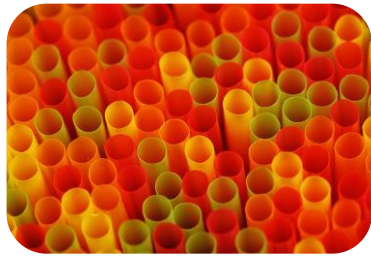
# Biofilms dans l'industrie alimentaire

Les bactéries présentes dans l'environnement agroalimentaire (sol, eau, aliment) peuvent avoir la capacité de s'attacher aux:

- différentes surfaces solides des équipements :



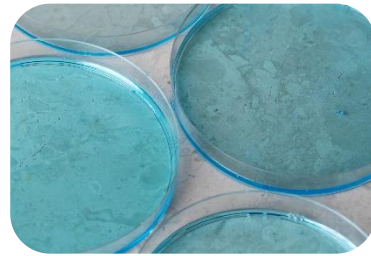
Acier  
inoxydable



Plastique



Bois



Verre



Caoutchouc

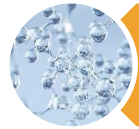
- Différentes structures biologiques comme les aliments

# Concept général

## Facteurs influençant la formation :



Type de surface



Nutriments



Conditions environnementales (T °C, HR %)



Temps



Forces mécaniques

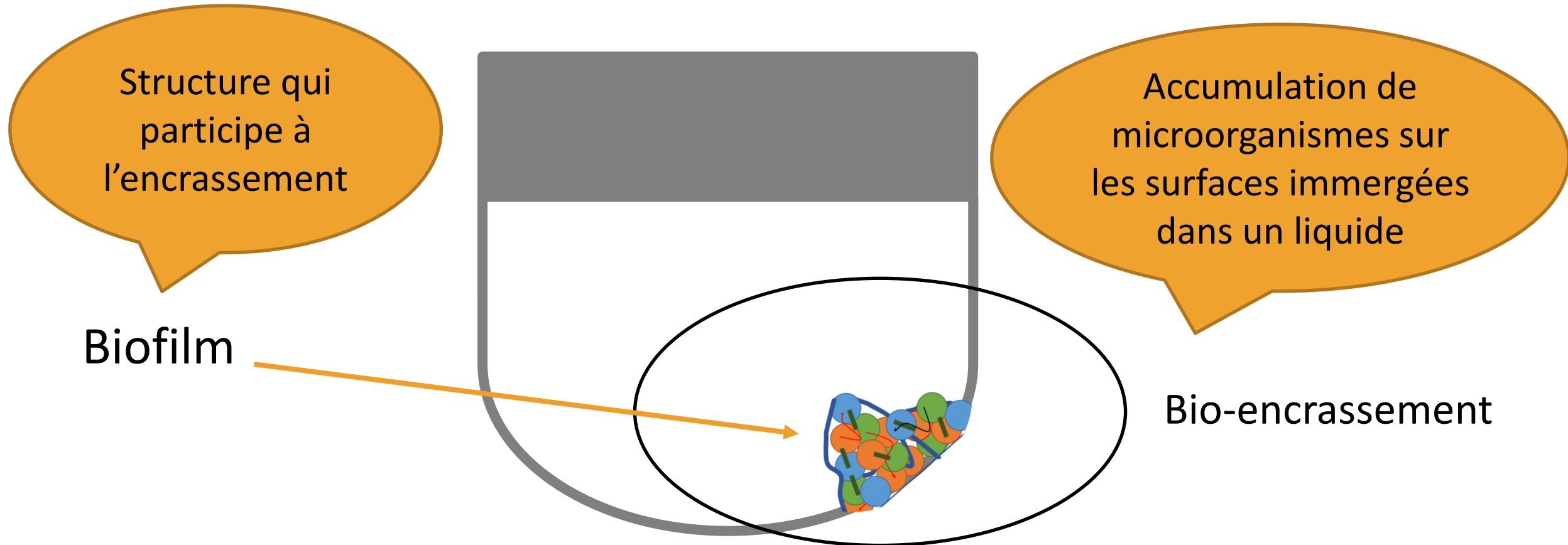
Film conditionnant



Illustrée par Nissa Niboucha

# Concept général

Biofilm *versus* Bio-encrassement (*Biofouling*) :





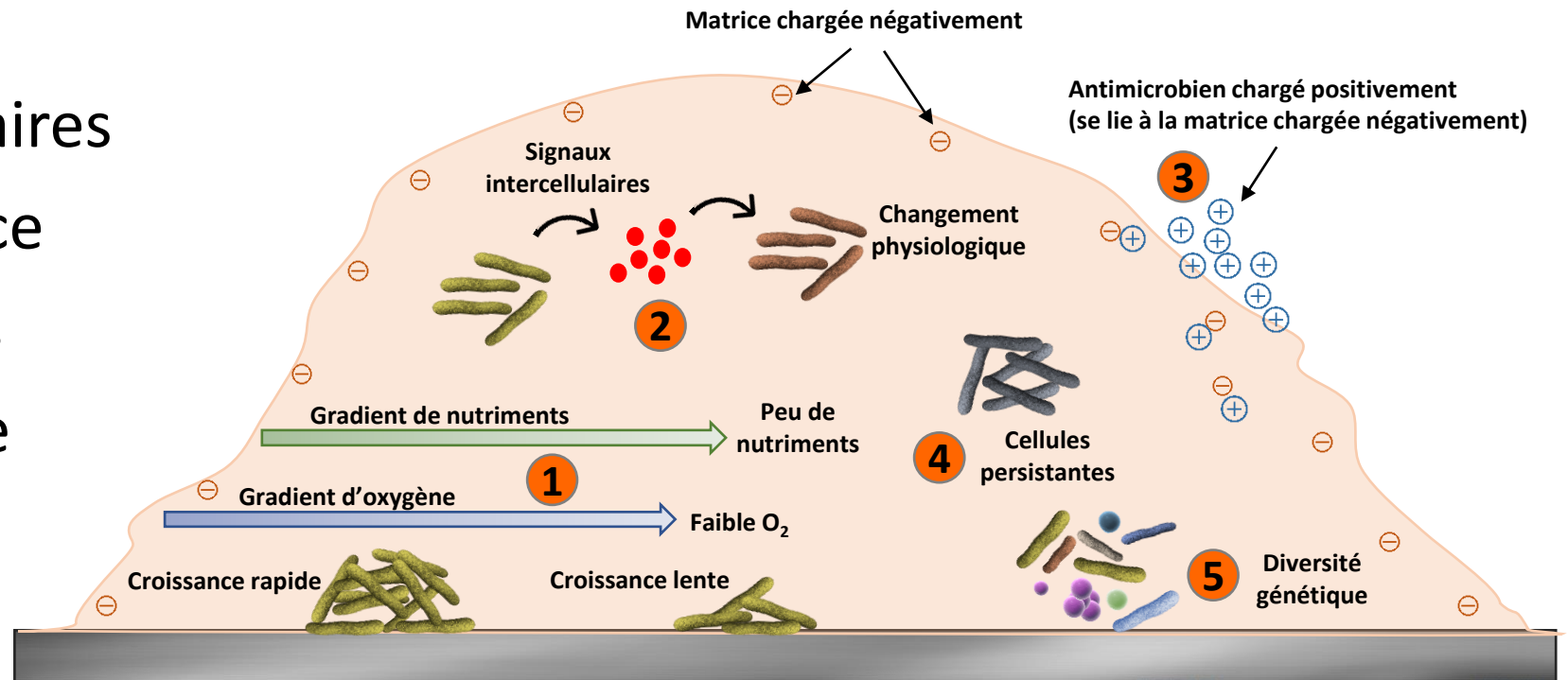
Saviez-vous que?

Les bactéries présentes dans les biofilms peuvent être jusqu'à 1 000 fois plus résistantes que lorsqu'elles sont libres (planctoniques)

# Concept général

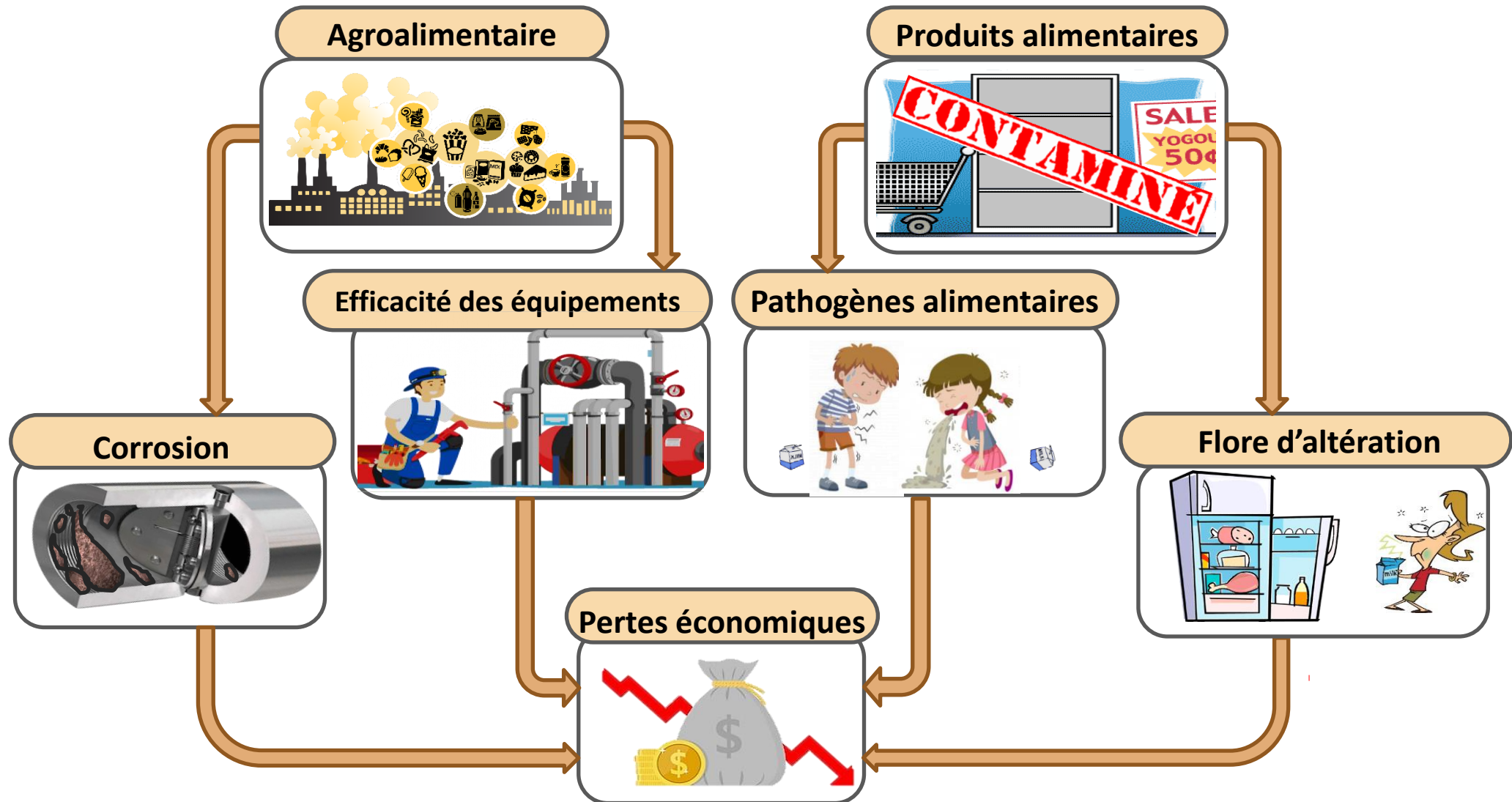
Le biofilm est une protection pour les microorganismes contre les conditions adverses, ex. : désinfectants et antibiotiques

1. Diffusion limitée
2. Signaux intercellulaires
3. Charge de la matrice
4. Cellules dormantes
5. Diversité génétique



Adapté de Ceri et al., (2010) par Nissa Niboucha

# Biofilms dans l'industrie alimentaire



# Biofilms dans l'industrie alimentaire

- Biofilms présents dans plusieurs secteurs agroalimentaire



Viande



Fruits et  
légumes



Laits et produits  
laitiers





Saviez-vous que?

Les bactéries présentes dans les biofilms peuvent être la cause d'écllosion de toxi-infections alimentaires

# Biofilms dans l'industrie alimentaire

*Listeria monocytogenes* dans du fromage à pâte molle aux É-U en 2015 :

- 30 personnes affectées dont 3 décès dans 10 états

*Listeria* est plus susceptible de se retrouver dans les fromages au lait cru.

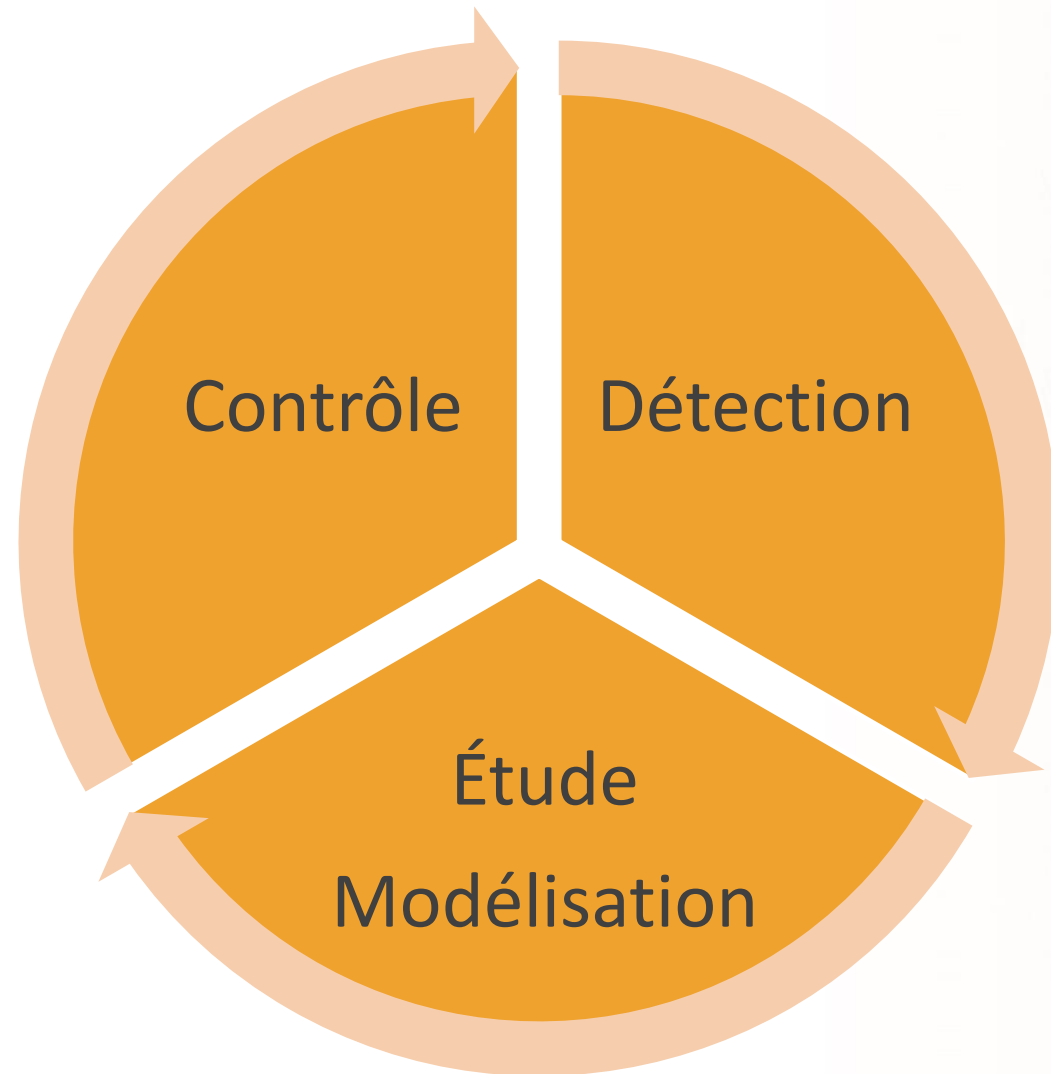
Affinage minimal de 60 jours





Discussion

# Comment étudier les biofilms





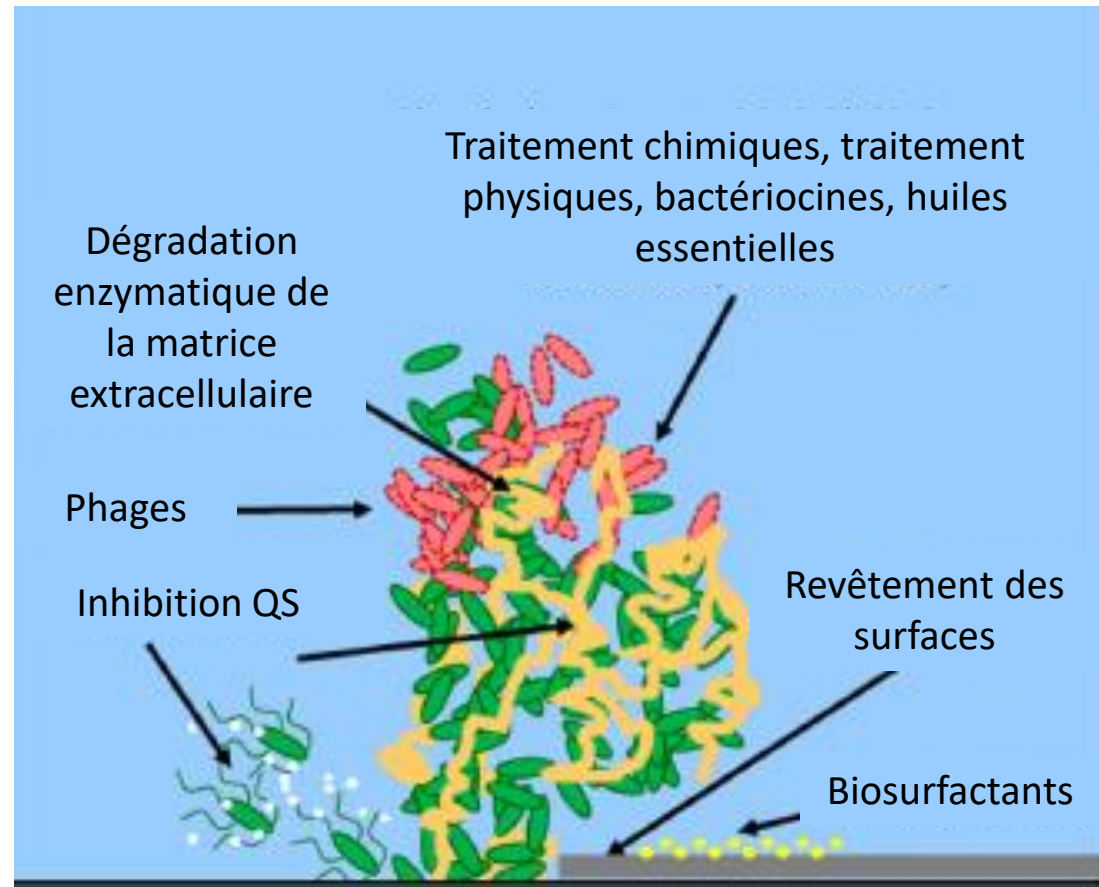
Saviez-vous que?

Les biofilms ne sont visibles qu'à l'œil nu que dans les pires cas.

# Méthode de contrôle

## Stratégies de contrôle

- Méthodes physiques
  - Chaleur, UV, etc.
- Méthodes biologiques
  - Enzymes, bactériophages, etc.
- Méthodes chimiques +++
  - NaOCl, acide peracétique, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etc.



Adapté de Galié et al., (2018) par Méricie Gagnon

# Méthode de contrôle

## Nettoyage en place (NEP) / *Cleaning in place* (CIP)



# Méthode de détection

\*Détection des biofilms se fait sur les surfaces propres pour éliminer les cellules libres

Méthodes conventionnelles :



Écouvillon



Éponge



Gélose de  
contact



ATP  
bioluminescence



# Méthode de détection



## Écouvillon et éponge



- Facile d'utilisation
- Permet d'échantillonner des surfaces non planes
- Facile d'obtenir une suspension cellulaire qui peut être utilisée à plusieurs escients (ex. différents milieux de culture, extraction d'ADN, etc.)
- La solution dans laquelle l'écouvillon trempe peut-être modifiée selon les besoins



- Attention, il existe plusieurs matériels
- Récupération des microorganismes (souci d'homogénéité)
- Petite surface de contact (écouvillon)
- Risque de contamination lors de la manipulation
- Pour une superficie donnée demande l'utilisation d'un gabarit



# Méthode de détection

## Gélose de contact



- **Très facile d'utilisation**
- **Étapes de manipulation réduites**
- **Temps de prélèvement réduit**
- **Risques de contamination liés à la manipulation sont limités**
- **Ne nécessite pas l'utilisation d'un gabarit**



- **Utilisation unique**
- **Un seul milieu de culture**
- **Convient seulement aux surfaces planes**
- **Coûteux**



# Méthode de détection

ATP  
bioluminescence



- Facile d'utilisation
- Étapes de manipulation réduites
- Détection rapide
- Pas de risques de contamination liés à la manipulation
- Ne nécessite pas l'utilisation d'un gabarit



- Coûteux
- Ne distingue pas l'ATP microbien de l'ATP non microbien (risque de faux positif)
- Ne permet pas de faire d'analyses microbiologiques par la suite



# Méthode de détection

Ultrasonication (ex. Bain à ultrasons)



- **Méthode standard de l'ASTM (ASTM E2871-19)**
- **Facile d'utilisation**
- **Pas de risque de contamination**
- **La suspension de biofilms récupérée dans le tube soumis à l'ultrasonication**



- **Coûteux**
- **Convient seulement au prélèvement sur des surfaces de petite taille (ex. Coupons, microplaques, lames, pièces dissociées d'un équipement..)**



# Méthode de détection

## Nouvelles méthodes : Éponge sonique



- Combinaison d'une éponge en polyuréthane avec une brosse à dent sonique
- Montage et utilisation facile
- Grande surface de contact
- Permet d'échantillonner des surfaces non planes
- Un sac stérile et une solution tampon neutralisante peuvent être fournis
- Libère toutes les bactéries dans la solution tampon
- **Convient à un prélèvement aux endroits étroits en utilisant le format adapté (à suivre)**



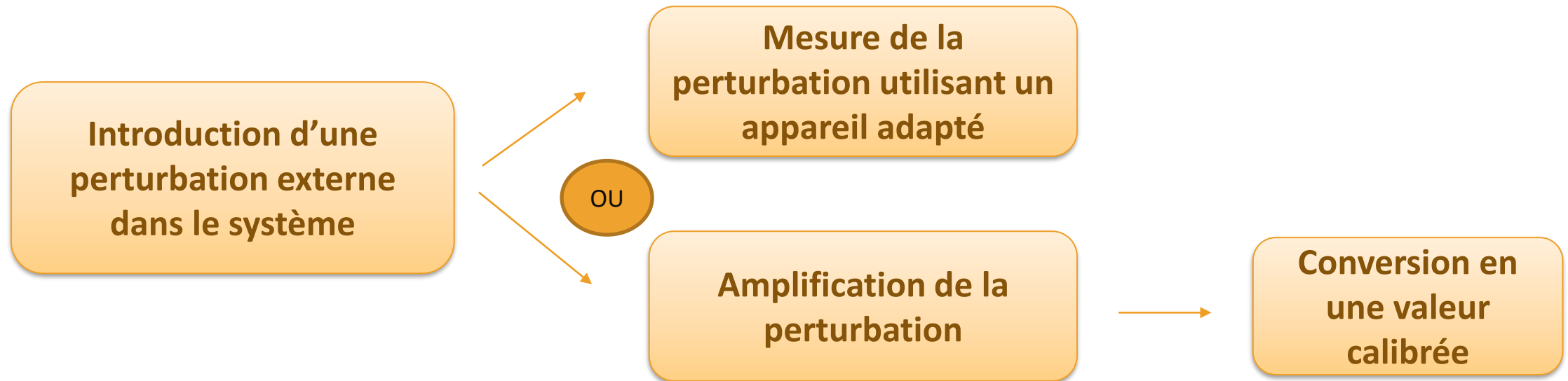
- Risque de contamination lors de la manipulation
- Pour une superficie donnée demande l'utilisation d'un gabarit
- Ne convient pas à certains endroits étroits

# Méthode de détection

Nouvelles méthodes :

- Détection en continue :

- Contrôle continu de paramètres influencés par la présence de biofilms (transfert de chaleur, signaux électrochimiques...)





Saviez-vous que?

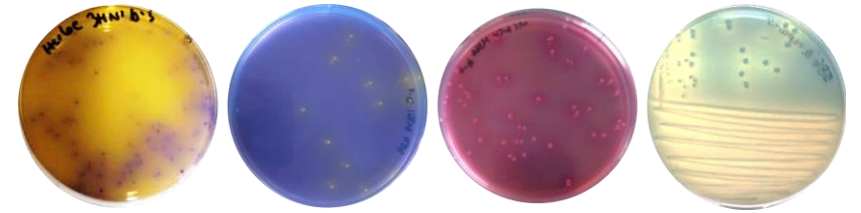
Les bactéries peuvent être en état viable, mais non cultivable, c'est-à-dire qu'elles ne seront pas en mesure de croître sur des milieux de culture

# Études des biofilms

Caractérisation microbiologique des biofilms:

- Microbiologie classique

- Dénombrement
- Résultats biaisés par les cellules viables, mais non cultivables,
- Résultats biaisés par les types de milieux choisies, etc.
- Technique supplémentaire pour l'identification des microorganismes



Séquençage  
(ADN)

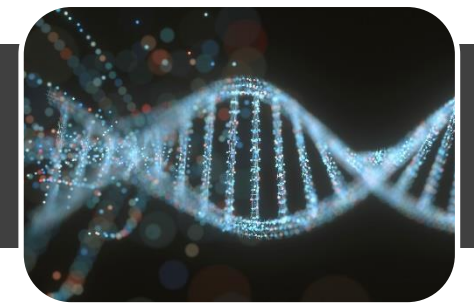


MALDI-TOF  
(Protéine)

**Nouvelle technique d'identification,  
peu coûteuse et de plus en plus  
accessible.  
Dépendante de la base de données**



# Études des biofilms



## Caractérisation microbiologique des biofilms:

- Biologie moléculaire
  - Dénombrement de la population totale ou seulement des cellules viables (qPCR)
  - Analyse complète de la population grâce à la métataxonomique (séquençage à haut débit)
  - Coûteux et nécessite du personnel qualifié, notamment pour les analyses de bio-informatique.

# Études des biofilms



## Types de modèles expérimentaux :

### Modèles fermés ou **statiques**:

- Compte bactérien
- Microplaques 96 puits
- “*Biofilm ring test*”
- “*Calgary Biofilm device*”

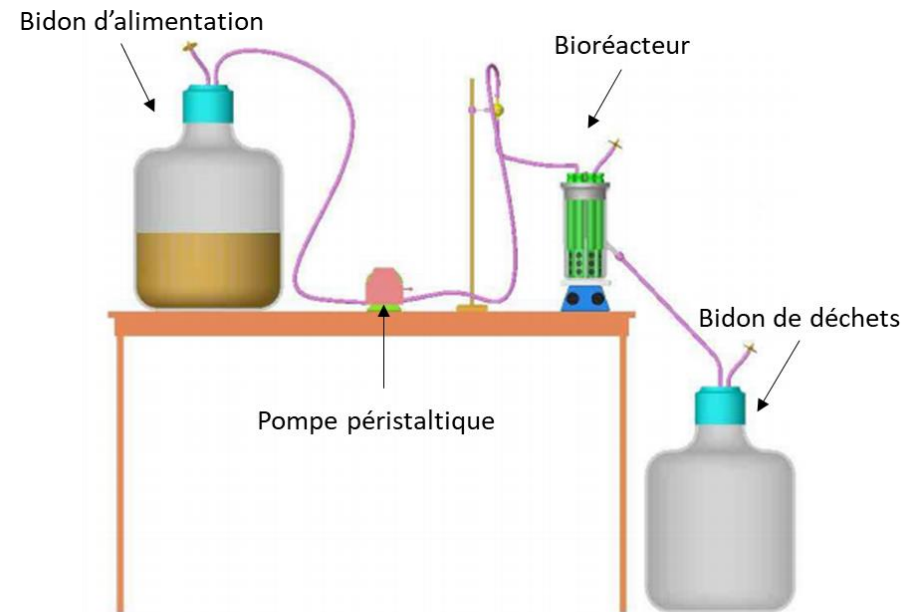
### Modèles ouverts ou **dynamiques**:

- “Flow cell”
- “Drip flow cell”
- Microfluidique
- Bioréacteur de type CDC

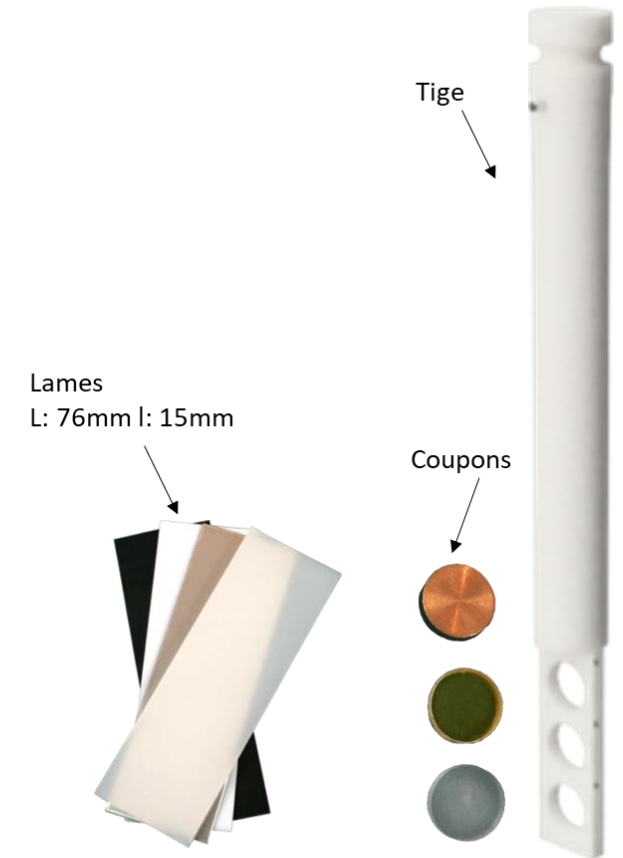
# Études des biofilms

## Bioréacteur de type CDC adapté pour l'industrie laitière

- Arrivée continue de milieu frais (lait)
- Environnement contrôlé
- Force de cisaillement
- Plusieurs types de surface



**Figure 1:** Schéma du système de bioréacteur CDC



**Figure 2:** Schéma détaillé de la tige, des coupons et des lames

# Études des biofilms

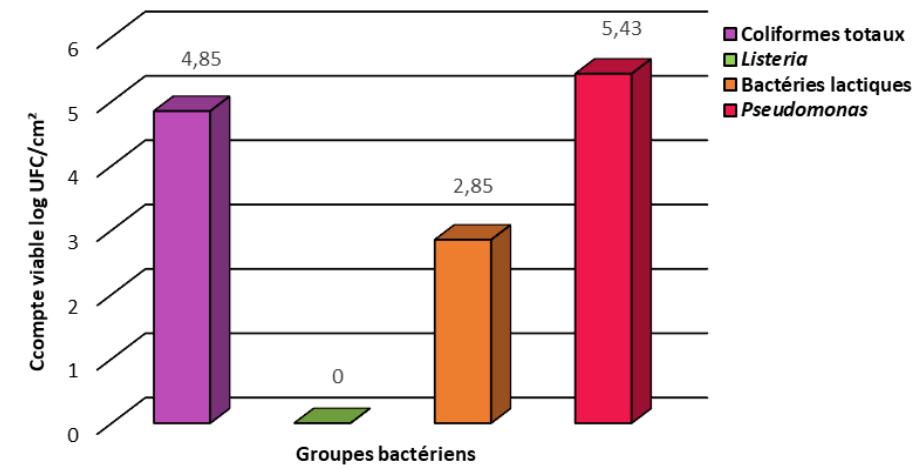
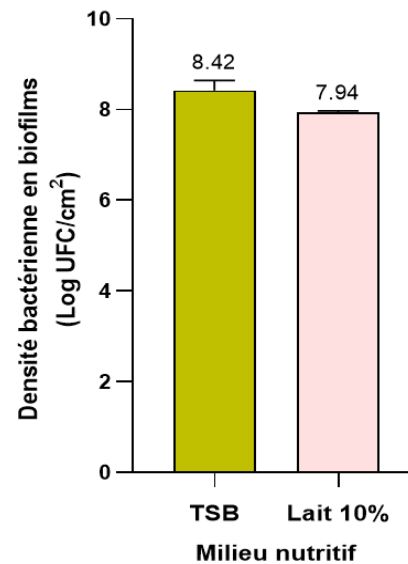
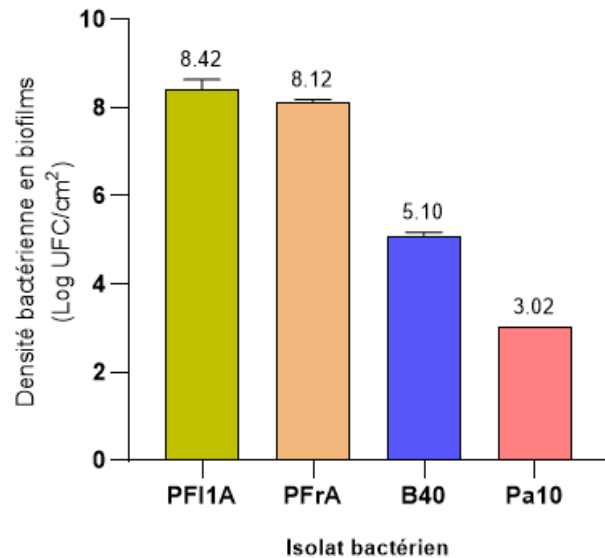


# Études des biofilms

## Bioréacteur de type CDC adapté pour l'industrie laitière

Niboucha et al., (en rédaction)

PF1A (*Pseudomonas azotoformans*)  
PFrA (*Pseudomonas fragi*)  
B40 (*Brevundimonas vesicularis*)  
Pa10 (*Peaenibacillus odorifer*)



Formation de biofilms avec des bactéries isolées d'usines de transformation laitière dans le milieu TSB

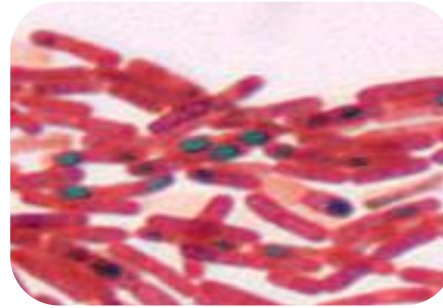
Formation de biofilms avec *P. azotoformans* dans deux milieux de culture différents

Groupes bactériens dans les biofilms formés dans le bioréacteur à 4°C à partir de lait cru

# Études des biofilms

Capacité de 6 souches thermorésistantes à former des biofilms laitiers

- Biofilms simples
- Biofilms mixtes



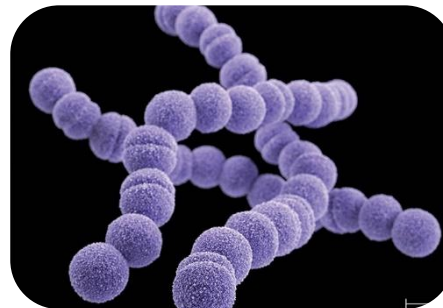
*Bacillus licheniformis*  
(sporulé)



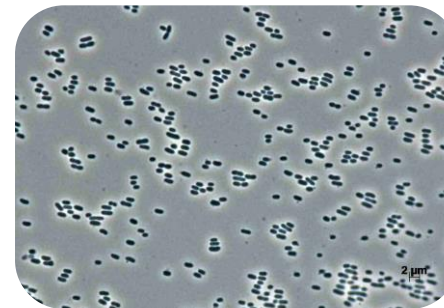
*Enterococcus faecalis*  
(protéolytique)



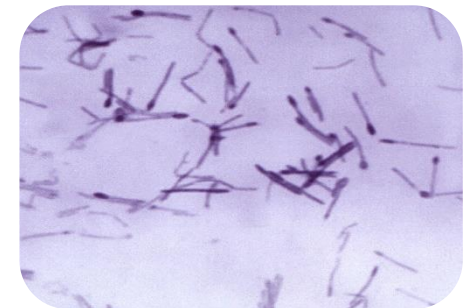
*Pseudomonas aeruginosa*  
(pigment bleu)



*Streptococcus thermophilus*  
(hautement acidifiante)



*Rothia kritinae*  
(abondante, mais peu connu)

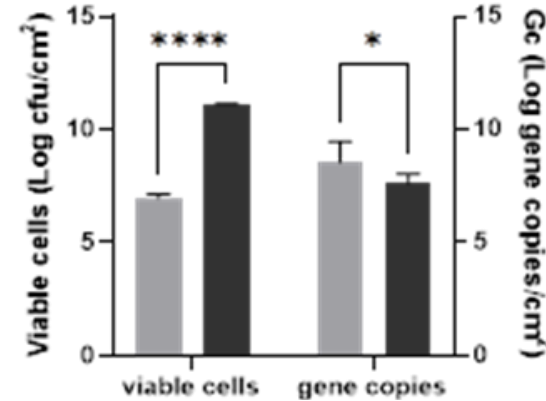


*Clostridium tyrobutyricum*  
(sporulé butyrique)

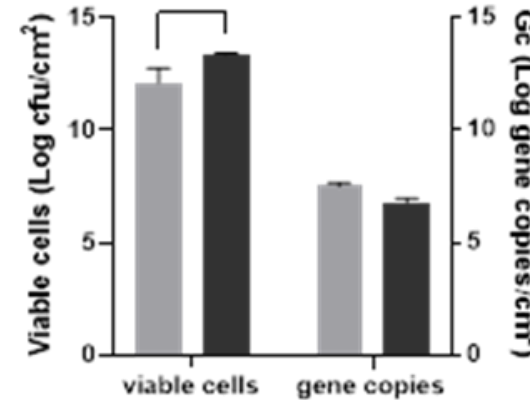
# Études des biofilms

- Bactéries fortes + et faibles - productrices de biofilm
- Les 6 bactéries thermorésistantes peuvent cohabiter dans le même biofilm
- *C. tyrobutyricum* présent mais en état VBNC

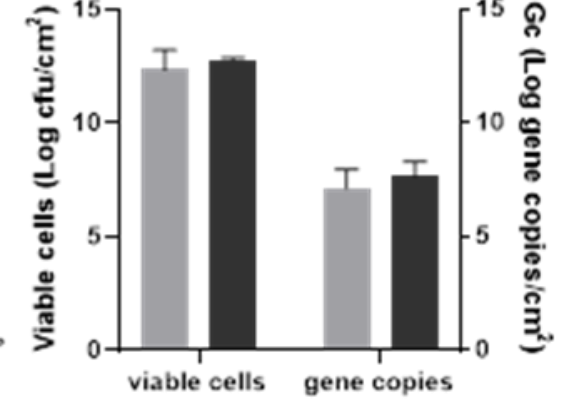
+ *Bacillus licheniformis*



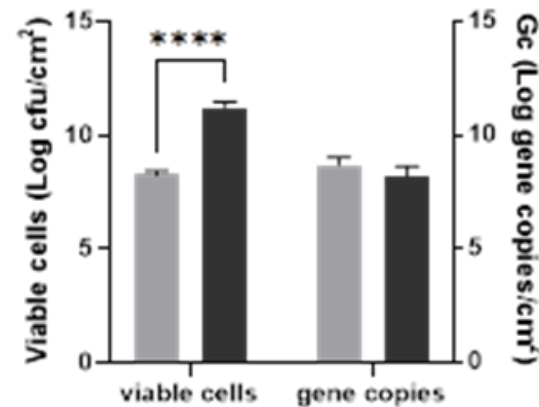
+ *Enterococcus faecalis*



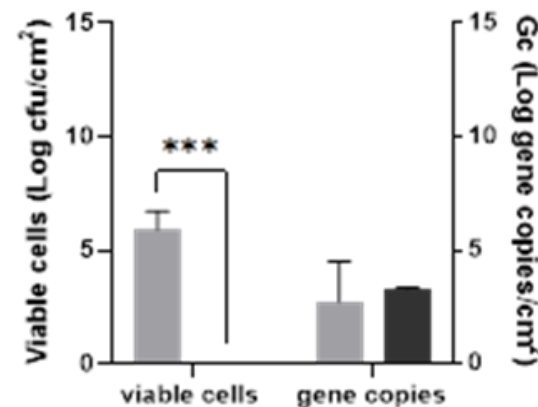
+ *Pseudomonas aeruginosa*



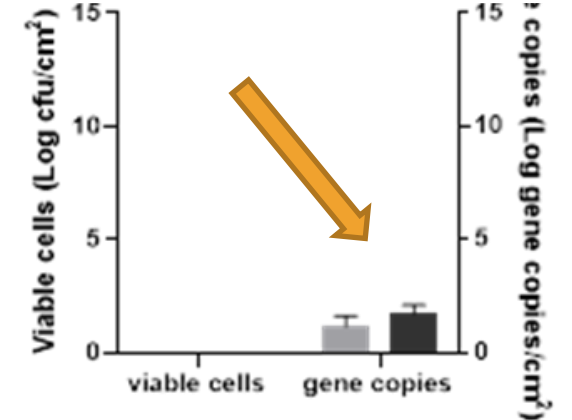
+ *Streptococcus thermophilus*



- *Rothia kristinae*



- *Clostridium tyrobutyricum*

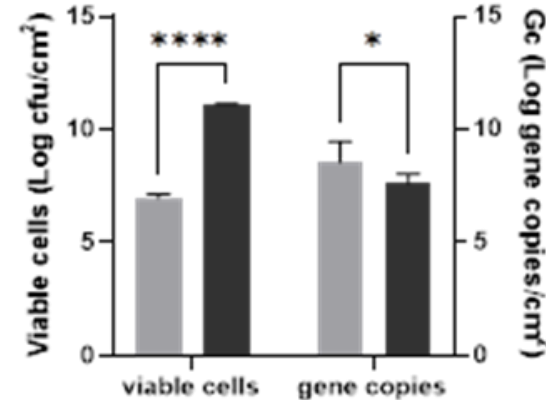


■ Single species biofilm    ■ Multispecies biofilm

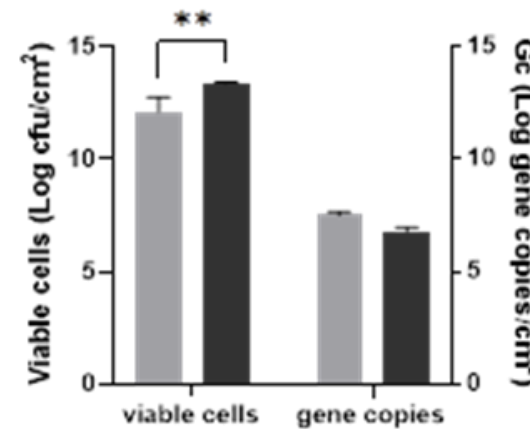
# Études des biofilms

- Bactéries fortes + et faibles - productrices de biofilm
- Les 6 bactéries thermorésistantes peuvent cohabiter dans le même biofilm

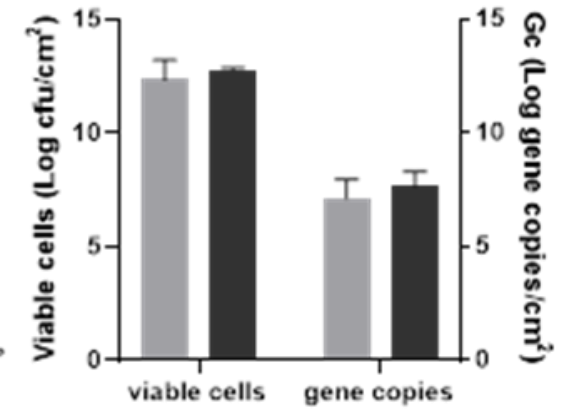
+ *Bacillus licheniformis*



+ *Enterococcus faecalis*



+ *Pseudomonas aeruginosa*



+ *Streptococcus thermophilus*



- *Rothia kristinae*



- *Clostridium tyrobutyricum*



Selon les tests enzymatiques, les biofilms étaient constitués majoritairement de protéines et on suspecte qu'il s'agissent en partie de la protéine de lait coagulée par protéolyse et acidification. L'élimination des résidus de lait contribue au contrôle des biofilms.





Discussion

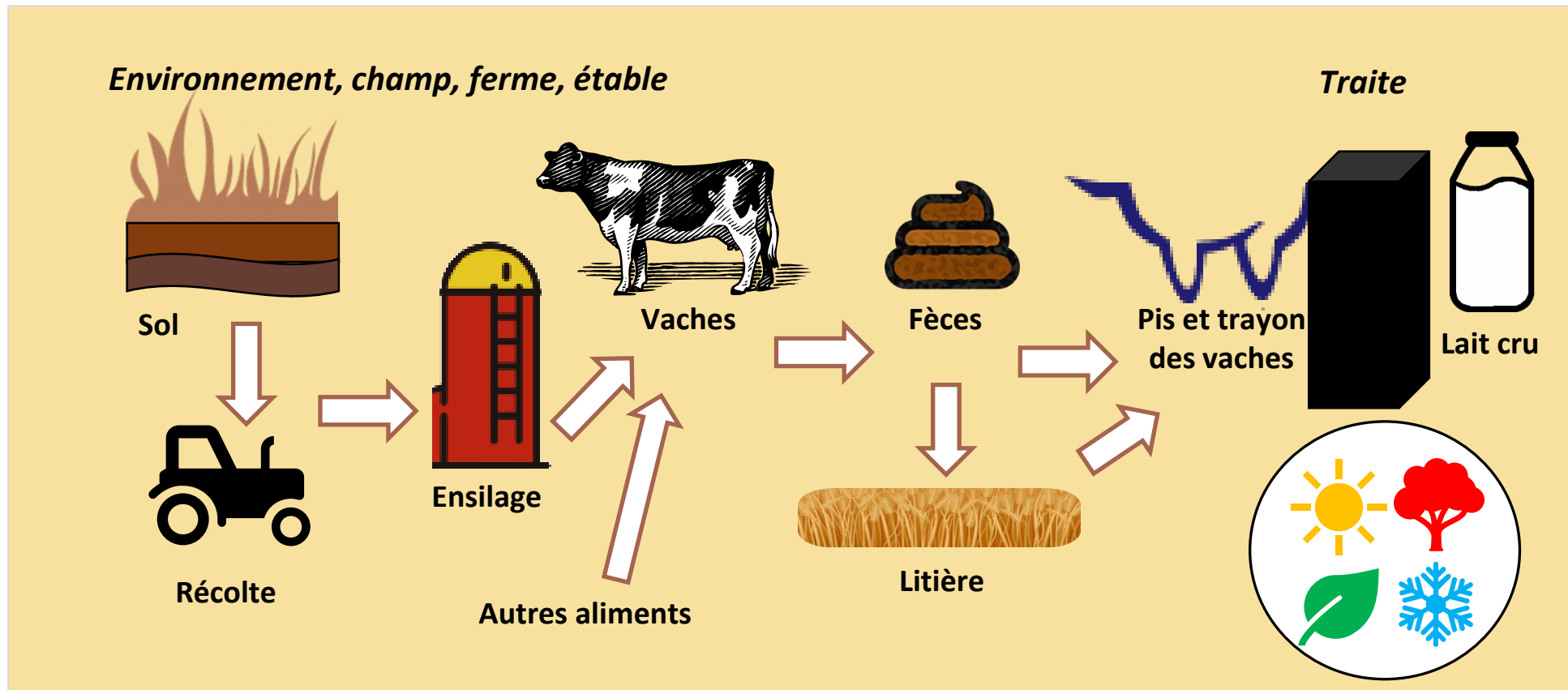


Saviez-vous que?

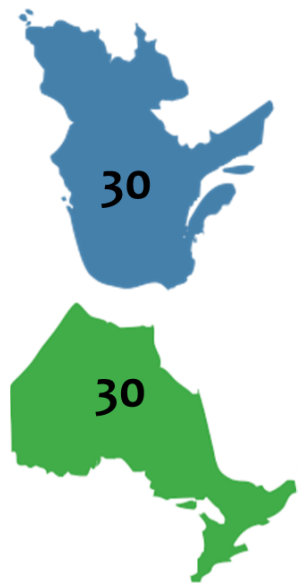
Il y a très peu de données sur les biofilms en production et transformation laitière au Canada

# Projet sur les biofilms laitiers

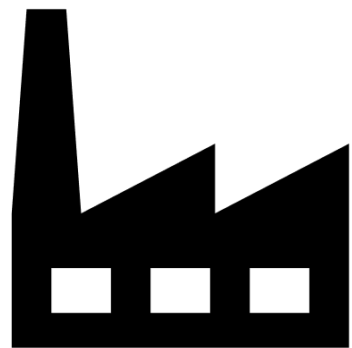
- Mieux comprendre le microbiote du lait pour améliorer la qualité des produits laitiers



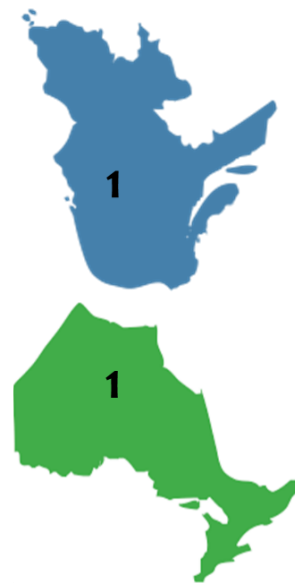
# Projet sur les biofilms laitiers



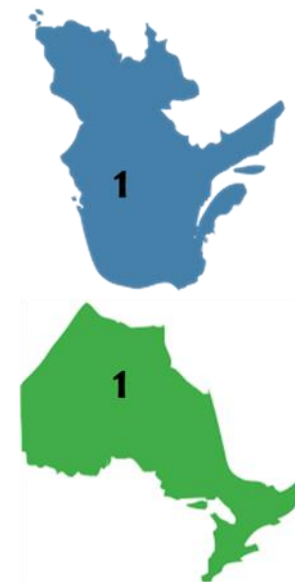
Fermes laitières



Fromagerie

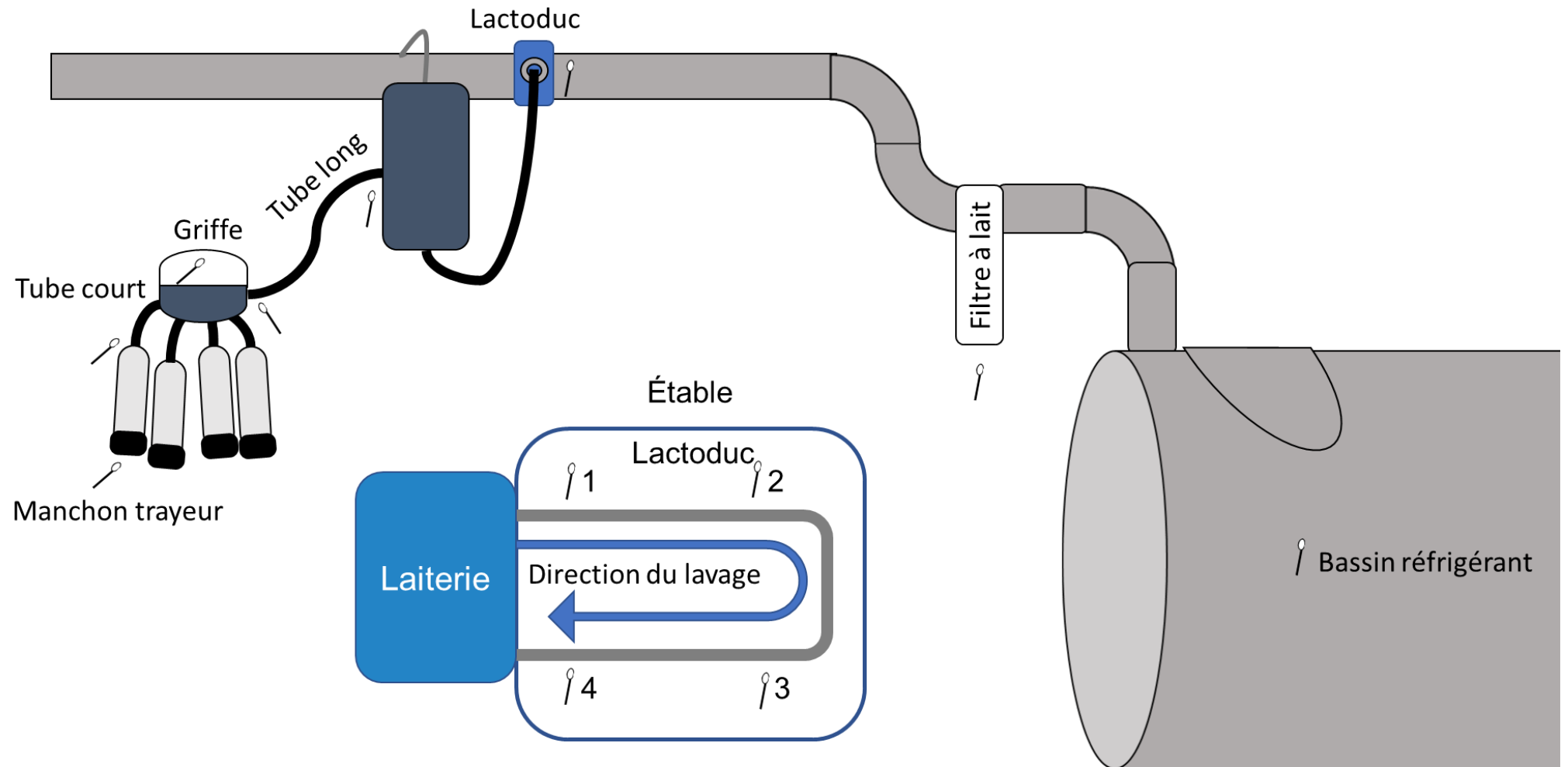


Fromagerie artisanale



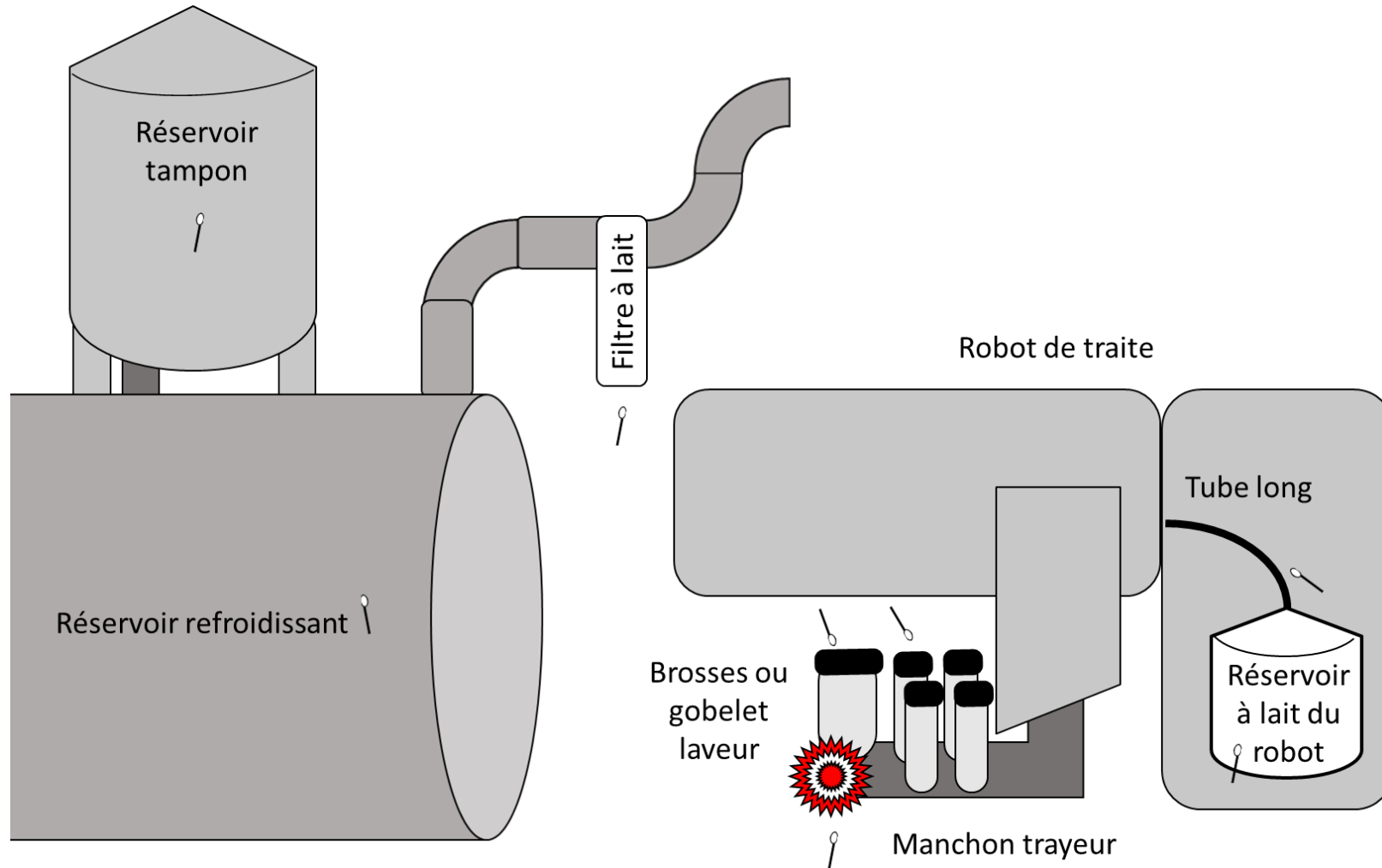
# Biofilms sur les fermes laitières

- CMS



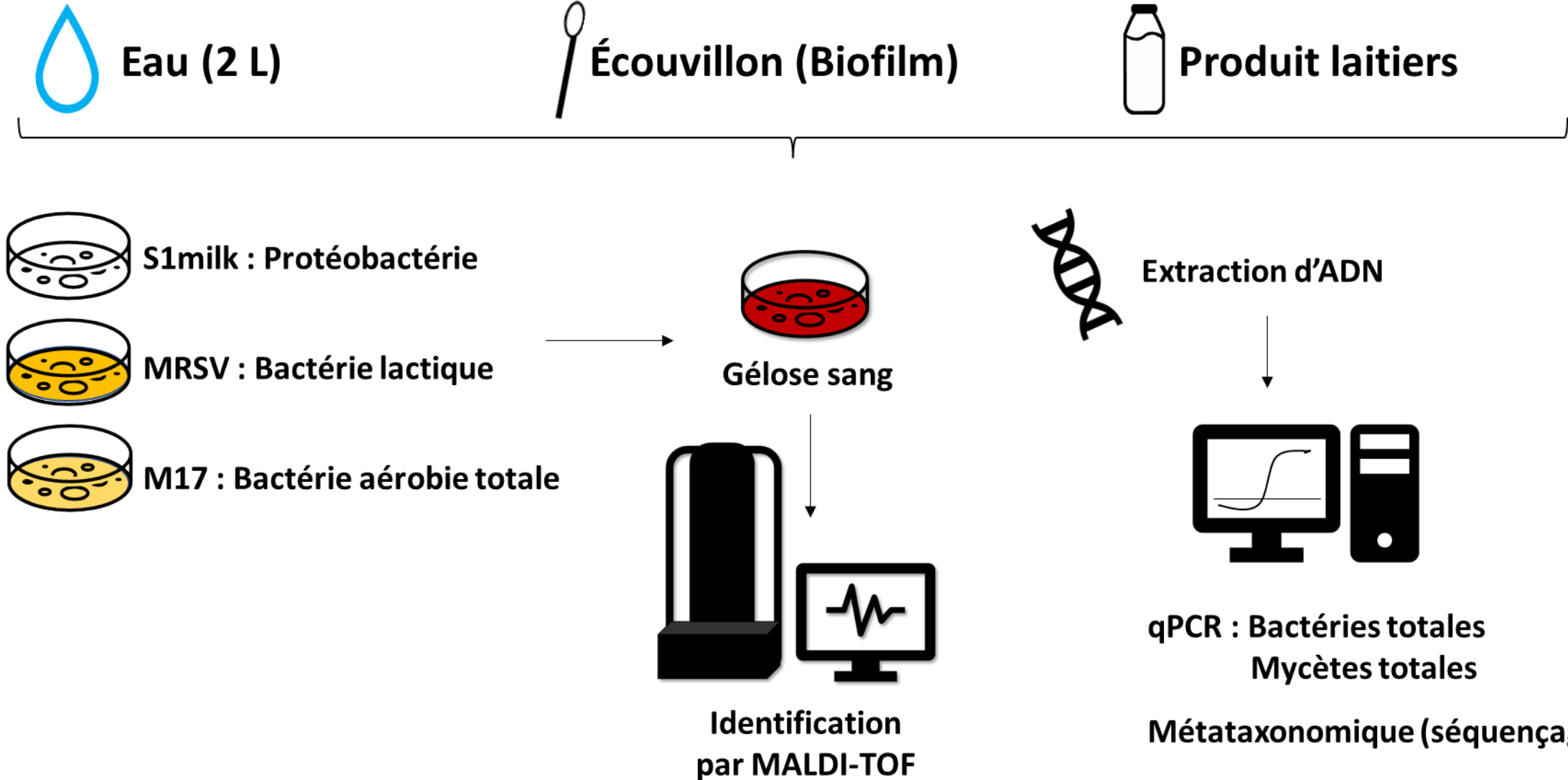
# Biofilms sur les fermes laitières

- AMS



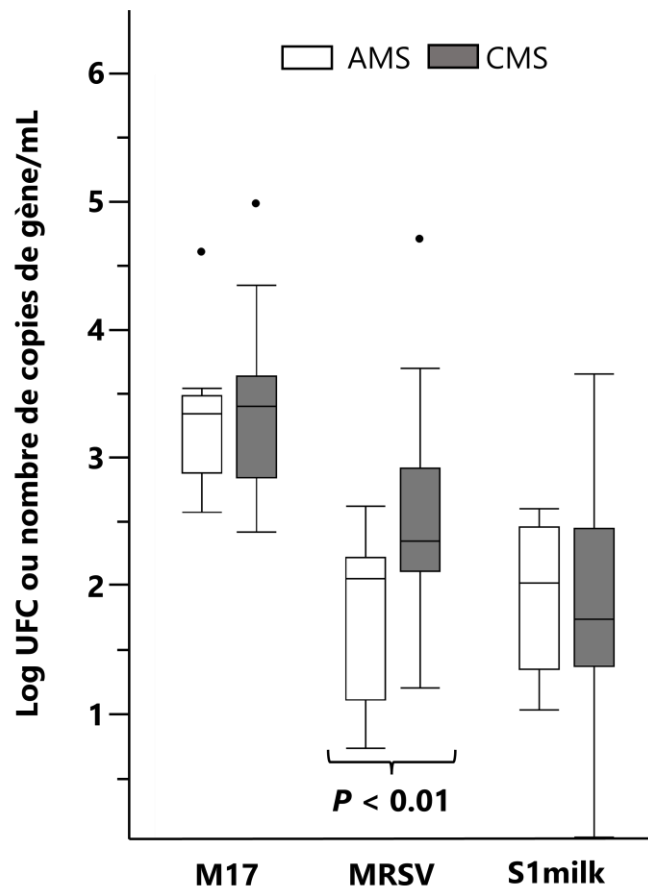
Ferme à traite robotisée

# Biofilms sur les fermes laitières



# Biofilms sur les fermes laitières

- Charge microbienne du lait



Compte plus faible sur MRSV le lait cru pour les fermes à traite robotisée :

1,77 log vs. 2,47 log d'ufc/mL

Isolat sur MRSV:

Bactéries lactiques 66% et  
26% de *Candida parapsilosis*

Au Québec : pas de différence de la charge microbienne entre l'été et l'automne



# Biofilms sur les ferm

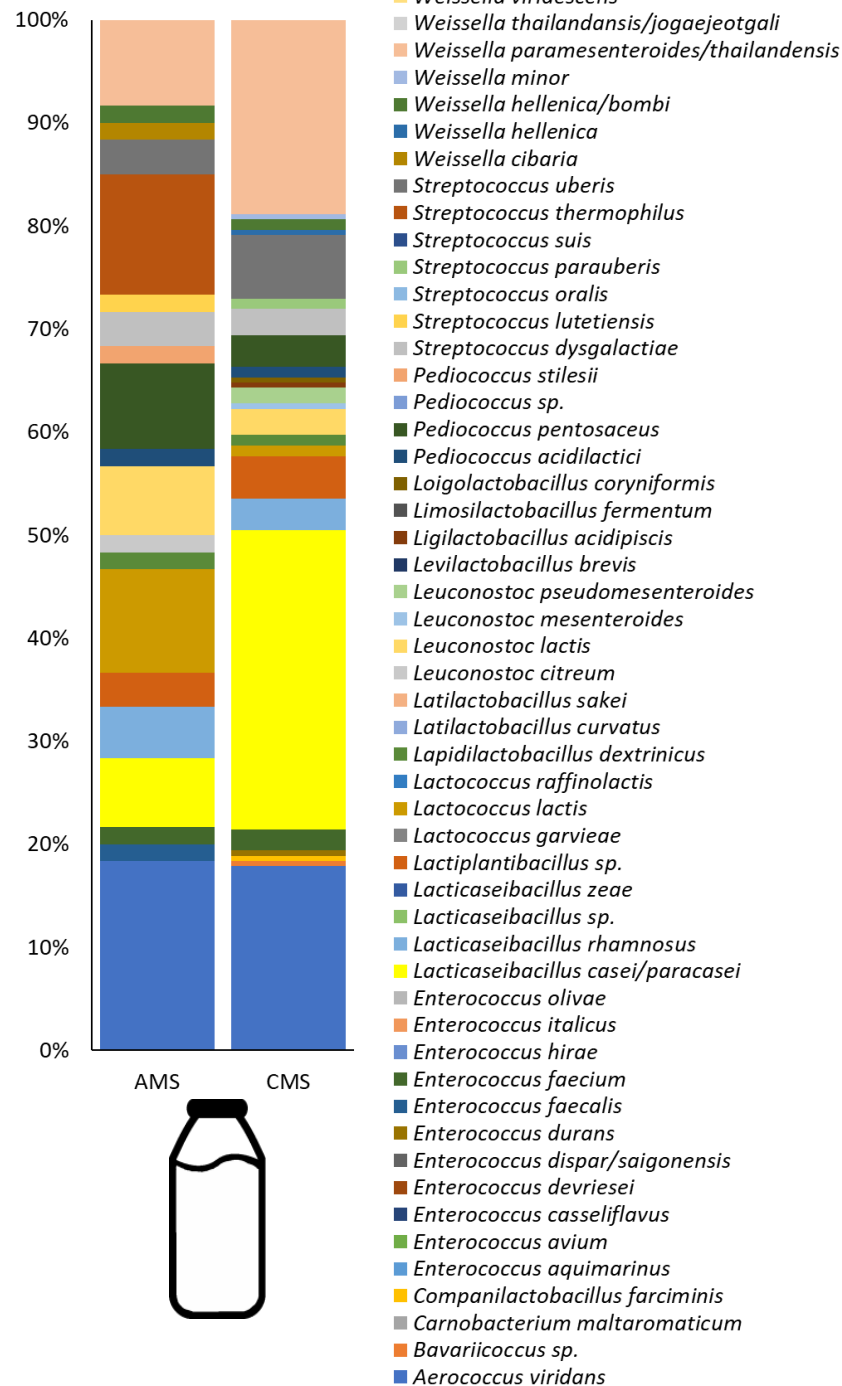
- Composition microbienne du lait



## Différences entre les systèmes de traite

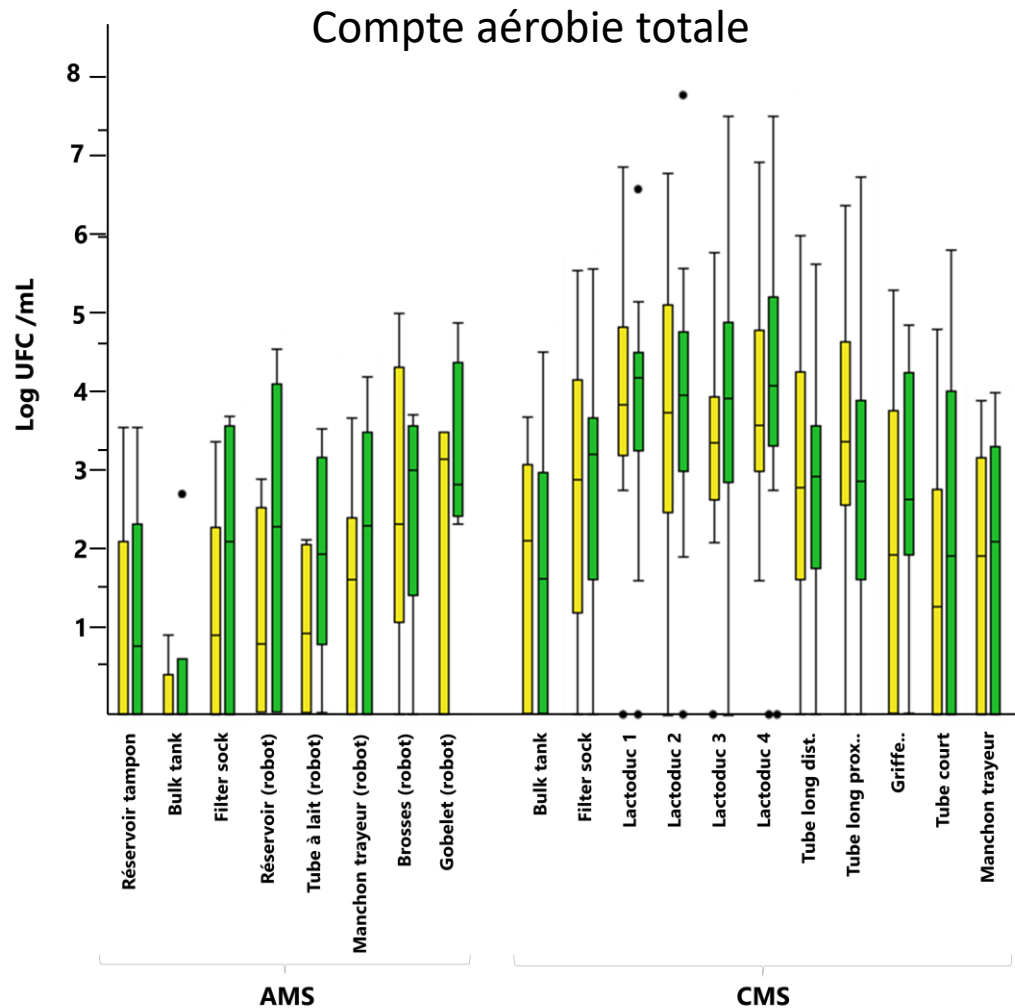
- Bactéries lactiques
- Protéobactéries
- Levures

Les espèces les plus abondantes dans lait ont aussi été retrouvés dans les biofilms analysés



# Biofilms sur les fermes laitières

- Charge microbienne des biofilms



The diagram shows a robotic milking system with various components labeled: 'Brosses ou gobelet laveur', 'Manchon trayeur', 'Réservoir à lait du robot', and 'Robot de traite'. Four orange callout boxes provide key findings:

- Détection de biofilm même directement après le lavage
- Grande variabilité entre les fermes
- Biomasse élevée dans le lactoduc (4 Log d'UFC / 10 000 ufc)
- Certaines stabilité entre l'été et l'automne



Saviez-vous que?

Les études sur la caractérisation microbiennes des biofilms prennent rarement en compte les levures et moisissures.

# Biofilms sur les fermes laitières

- Charge microbienne des biofilms 

Avec la quantification microbienne à partir de l'ADN, la charge microbienne était encore plus élevée

– En moyenne:

5 log de bactéries par échantillons (100 000)

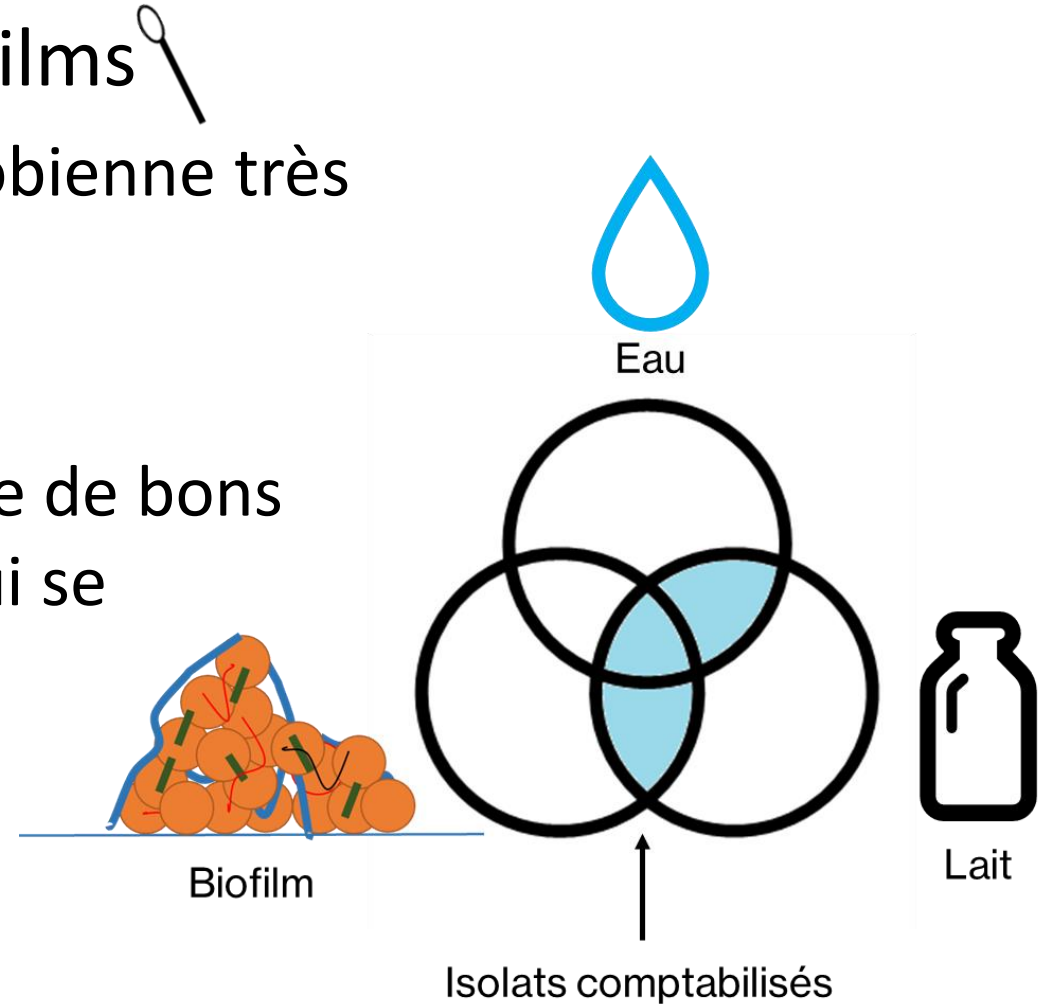
2 log de mycètes (levures et moisissures) (100)



**Il ne faut donc pas sous-estimer la présence des levures et moisissures dans les biofilm laitiers**

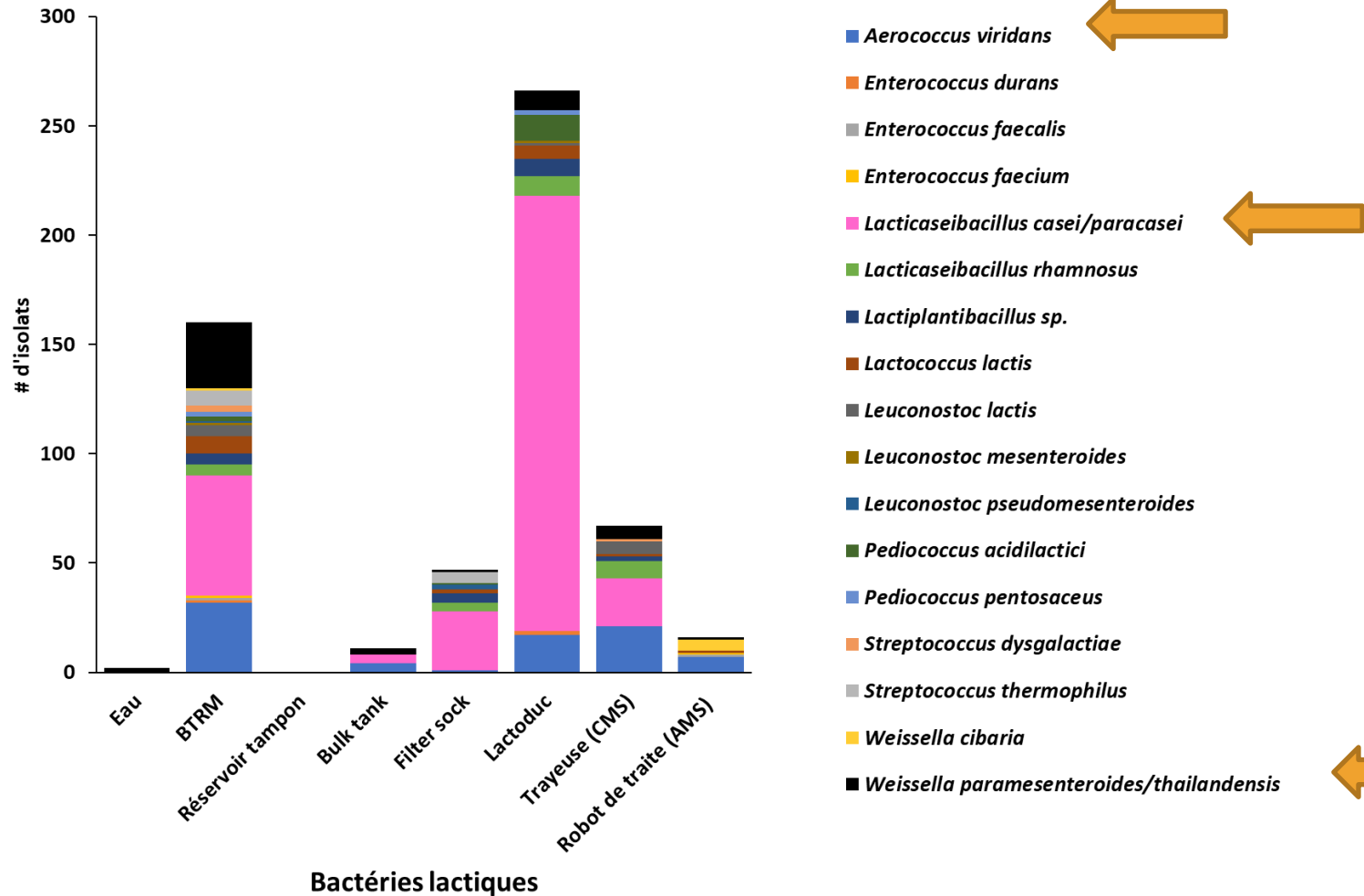
# Biofilms sur les fermes laitières

- Composition microbienne des biofilms  
Les biofilms ont une composition microbienne très diversifiée
- Analyse des transferts plausibles  
Le lactoduc et la trayeuse semblent être de bons réservoirs pour les microorganismes qui se retrouveront dans le lait cru




# Biofilms sur les fermes laitières

- Transferts plausibles 



# Biofilms sur les fermes laitières

- Transferts plausibles 
  - Microorganismes à cibler (rôle ou contrôle)

## Bactéries lactiques

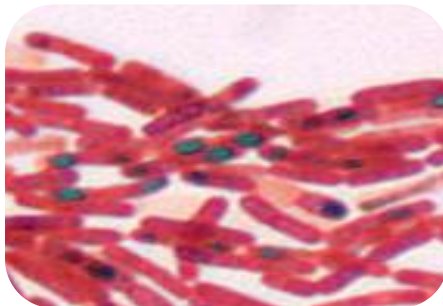
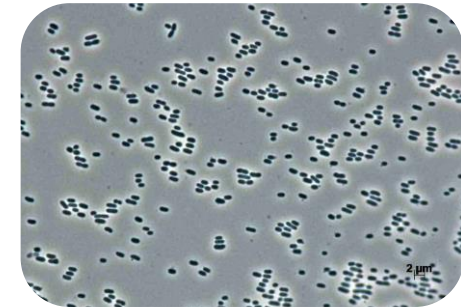
- *Aerococcus viridans*
- *Lacticaseibacillus casei/paracasei*
- *Weissella paramesenteroides*

## Protéobactéries

- *Escherichia coli*

## Levures

- *C. parapsilosis*
- *D. catenulata*



## Sporulés

- *Bacillus cereus*\*
- *Bacillus liqueniformis*

## Actinobactéries

- *Rothia kristinae*
- *Kocuria varians*
- *Corynebacterium phoceense*

## Staphylocoques

- *Staphylococcus xylosus*
- *Staphylococcus saprophyticus*

# Biofilms sur les fermes laitières

- **Recommandations**

- Inspection visuelle et changement plus fréquent du tube long à lait
- Ajout de nettoyage manuelle des brosses des robots de traite (fréquence à déterminer)
- Respecter les recommandations ProAction pour les procédures de nettoyage afin de limiter les résidus de lait, car les microorganismes qui protéolysent et acidifient le lait peuvent contribuer à la formation d'un film conditionnant

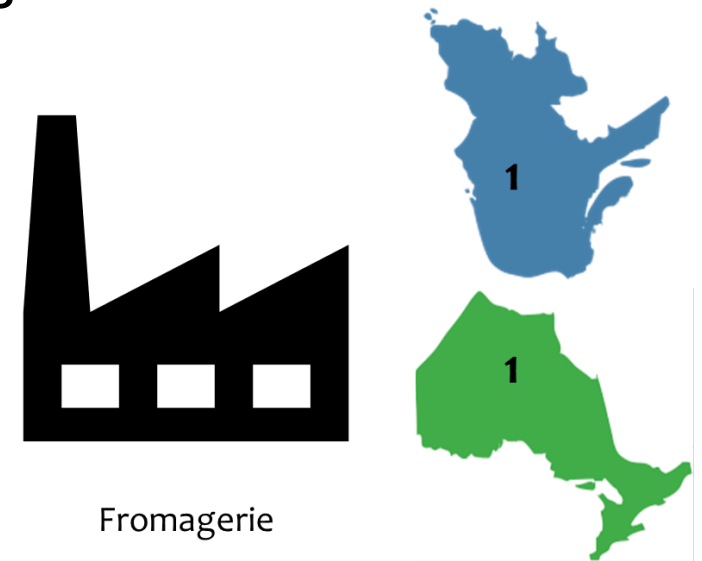
- **Perspectives**

- Vérifier si les protocoles de nettoyage devront être adaptés aux espèces retrouvées
- Déterminer s'il y a des biofilms protecteurs



# Biofilms dans les fromageries

- Fromageries industrielles
  - Charge microbienne des biofilms beaucoup plus faible, souvent absents ou sous la limite de détection
  - Microorganismes viables qui ont pu être détectés
    - *Streptococcus thermophilus*
    - *Kocuria rhizophila*
    - *Pseudomonas mendocina/oleovarans*
    - *Pseudomonas composti*



# Biofilms dans les fromageries

- Fromagerie à la ferme

- Québec : Fromage au lait cru

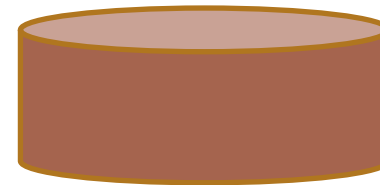
**2 x par mois pendant 6 mois**



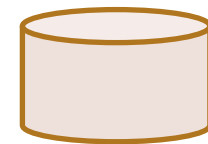
**Fromagerie artisanale**

- Ontario : Fromage au lait pasteurisé

**Suivi de 2 types de production  
Fromage de lait cru de vache**



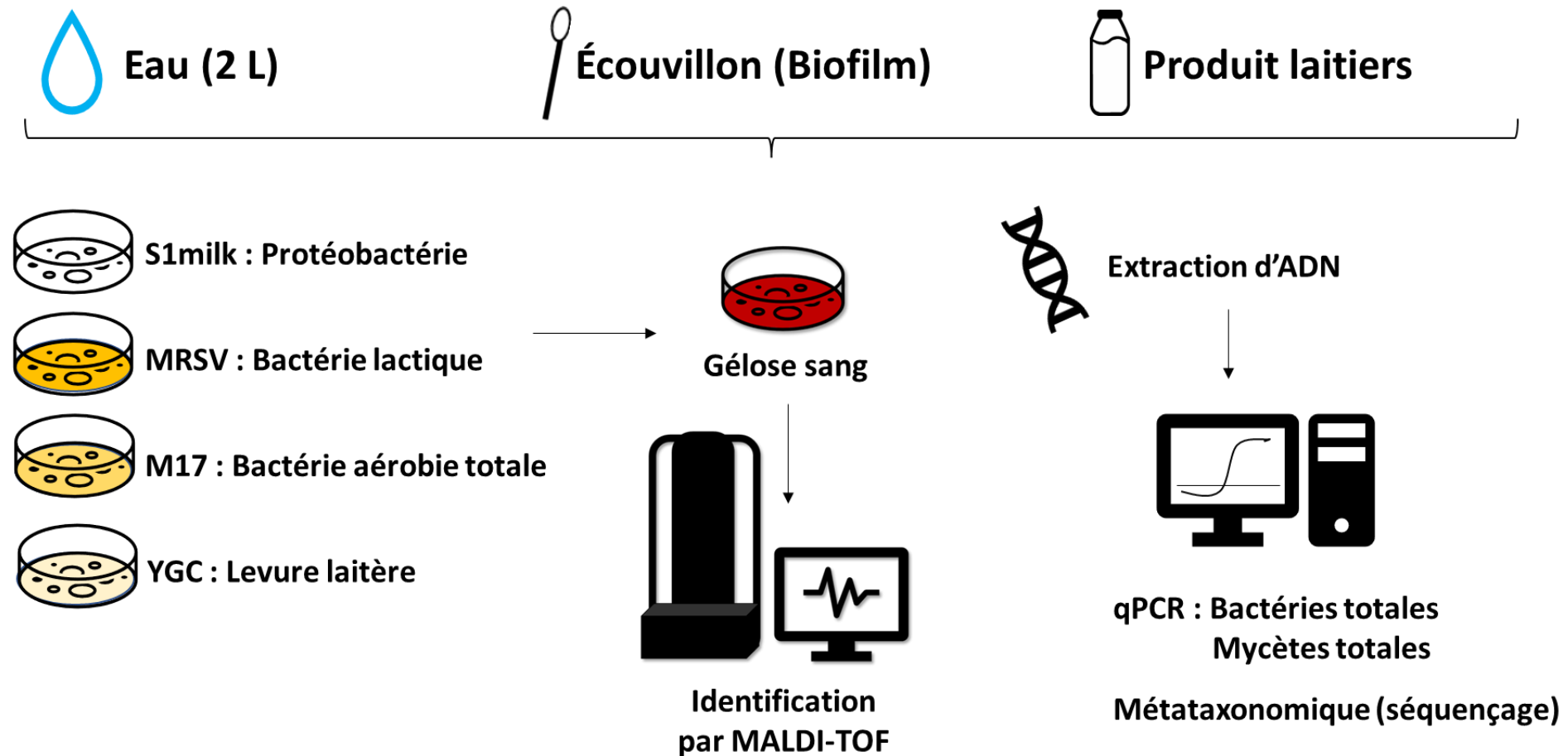
**Fromage  
à pâte pressée cuite**



**Fromage  
à pâte molle**

# Biofilms dans les fromageries

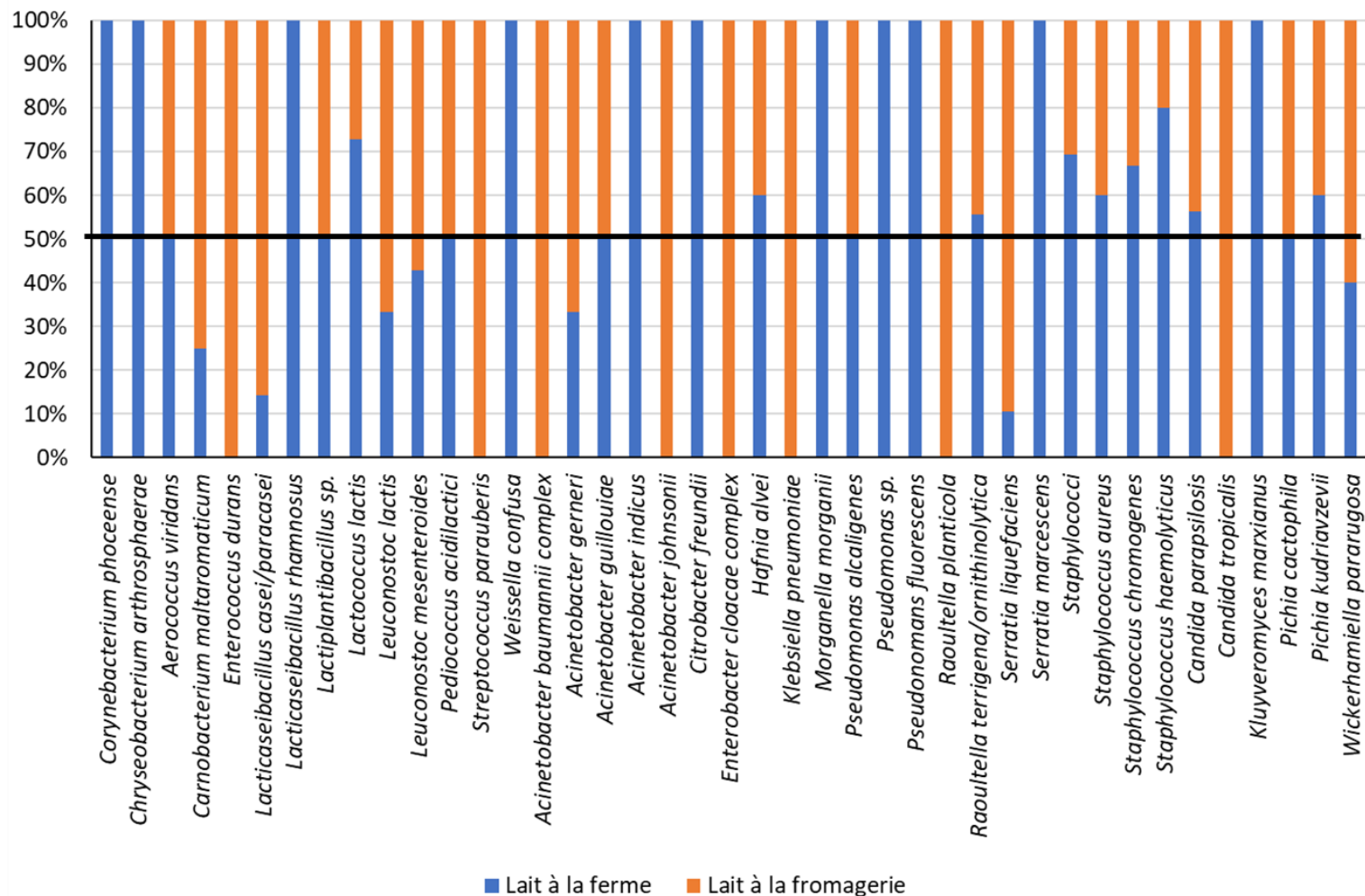
- Même méthodologie



# Biofilms dans les fromageries

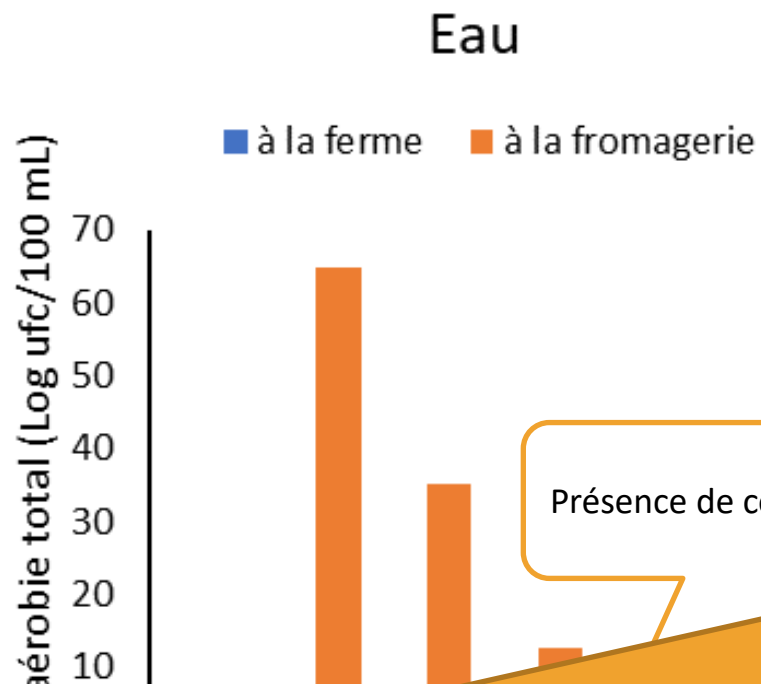
- Transport du lait

Que ce soit par tuyau ou par camion des différences dans le microbiote du lait peuvent être observées probablement en lien avec présence de biofilm



# Biofilms dans les fromageries

- Qualité de l'eau
  - Détection pendant les mois d'été
  - Contamination à la fromagerie (ex. tuyau, chauffe-eau, etc.)
  - Recommandation



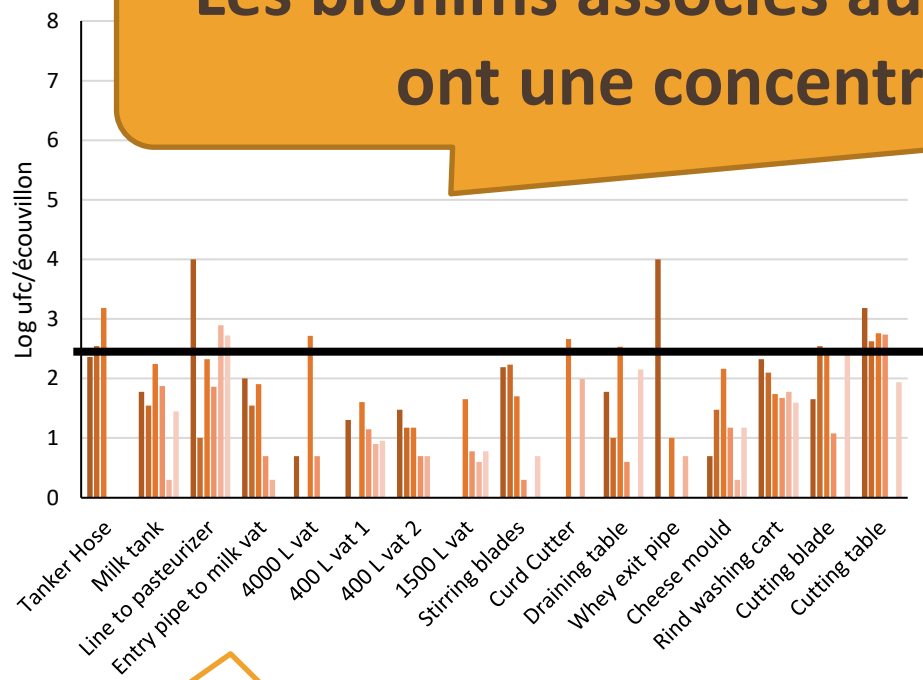
Présence de coliformes totaux : *Serratia liquefaciens*

**Les microorganismes dans l'eau peuvent être présents dans la saumure et pourraient former ou s'installer dans les biofilms et contaminer les fromages.**

# Biofilms dans les fromageries

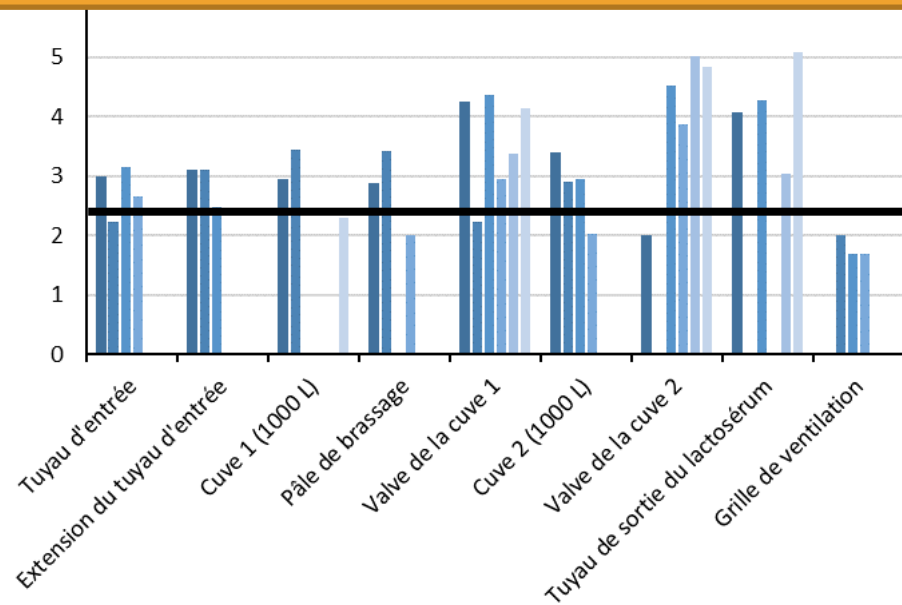
- Présence de biofilms sur les équipements
  - Tend à diminuer durant les mois les moins chauds

**Les biofilms associés aux surfaces en contact avec du lait cru ont une concentration microbienne plus élevée**



Fromagerie en Ontario

En moyenne, biofilm avec une concentration < 250 ufc

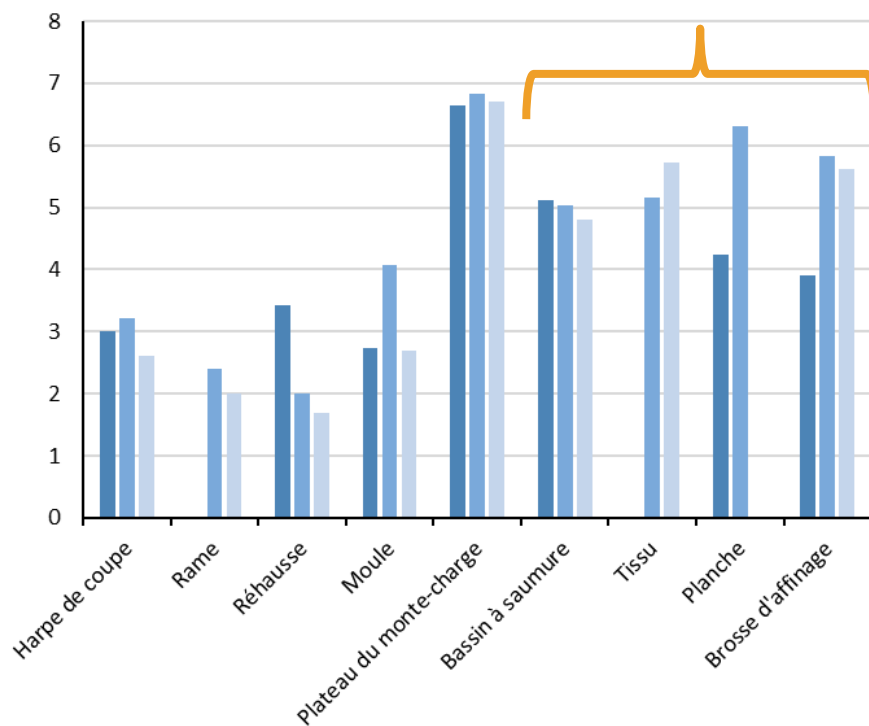


Fromagerie Québec -Tous les fromages

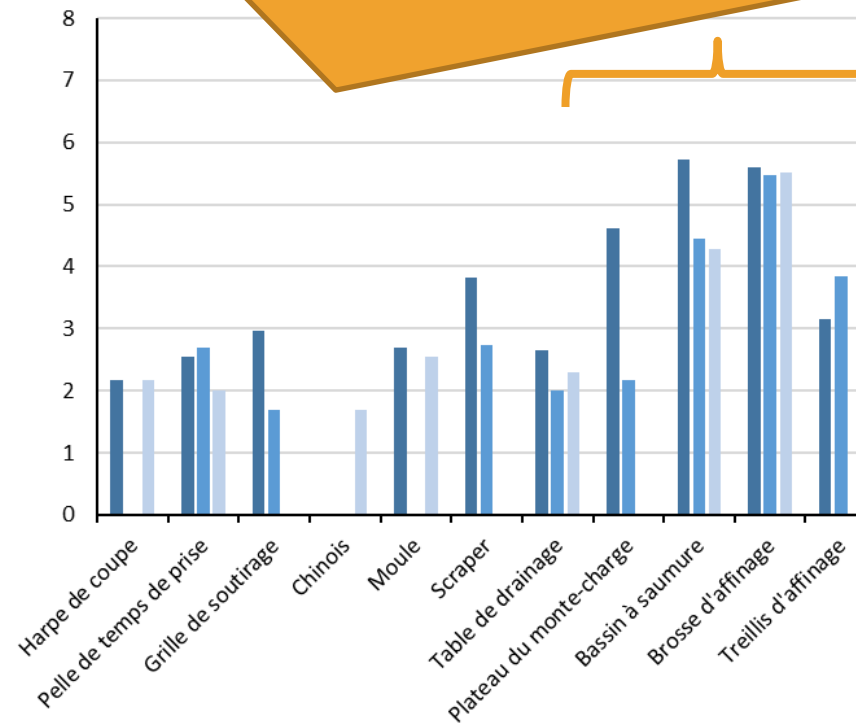
# Biofilms dans les fromageries

- Présence de biofilms sur les équipements
  - Équipements propres servant à l'affinage ont une concentration microbienne plus élevée.

**Positif pour l'affinage dépendamment de la composition microbienne**



Fromagerie Québec - Fromage à pâte pressée cuite

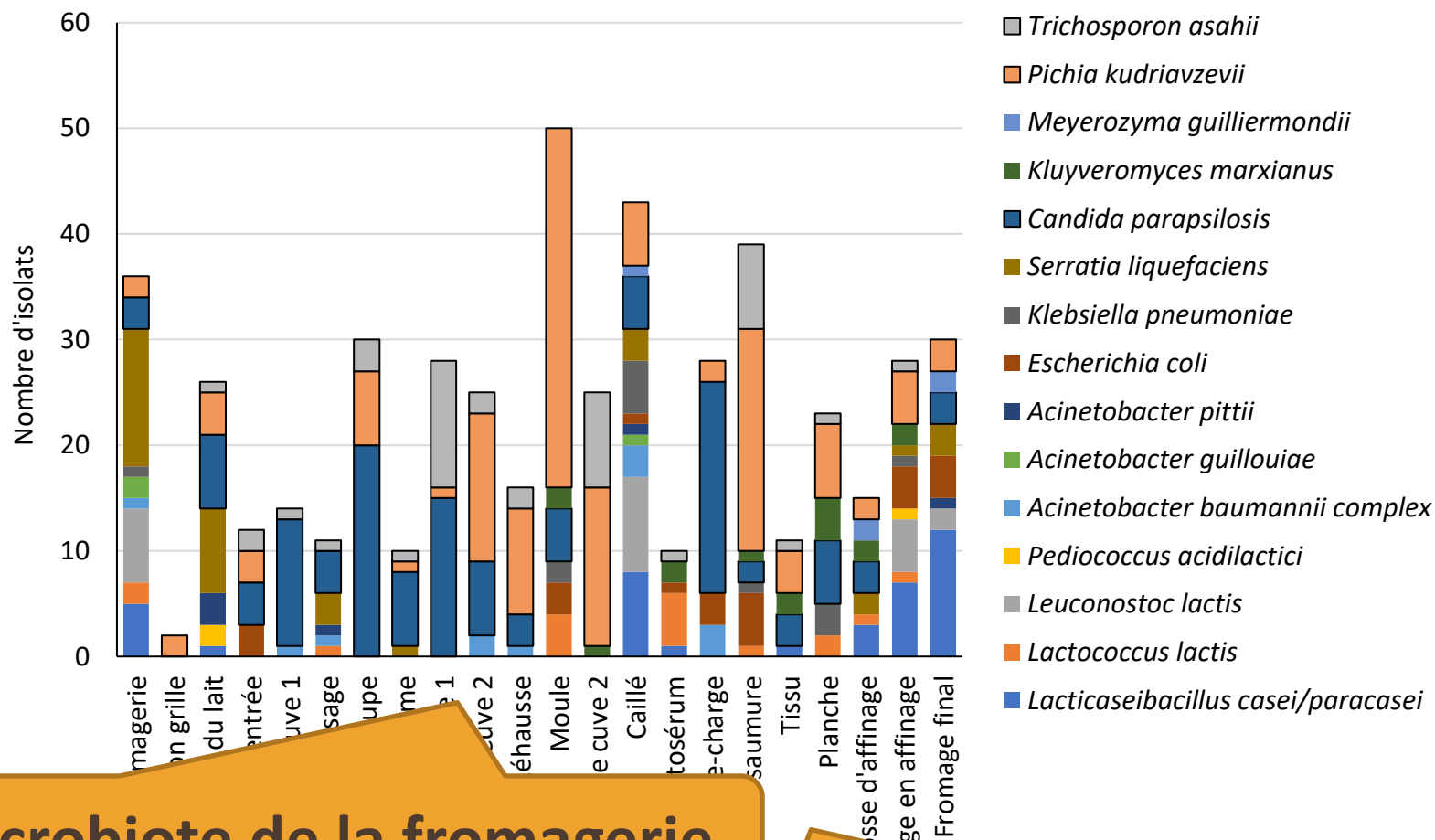


Fromagerie Québec - Fromage à pâte molle

# Biofilms dans les fromageries

- Composition des biofilms sur les équipements

- Faire attention à certains microorganismes qui sont présents dans les biofilms: ex. *Serratia liquefaciens*
- Plusieurs espèces retrouvées dans les biofilms tout au long de la fabrication et dans les fromages
- Le levures sont dominantes



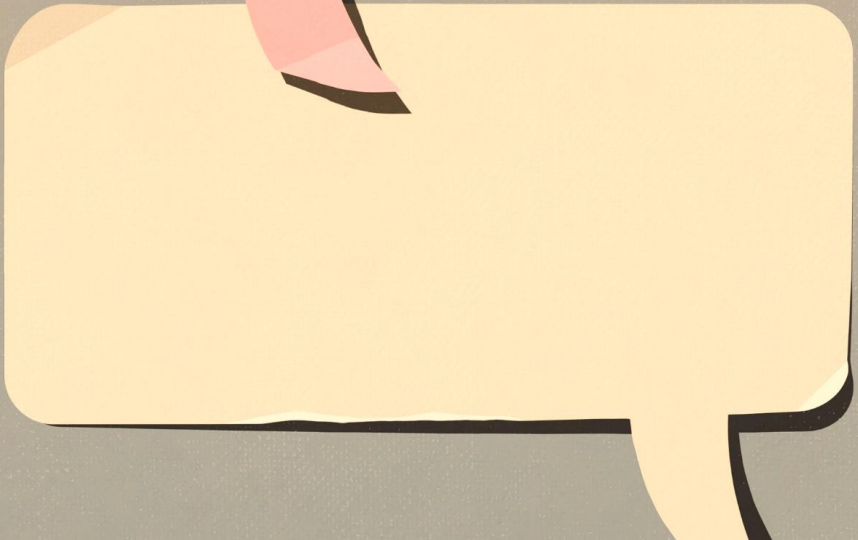
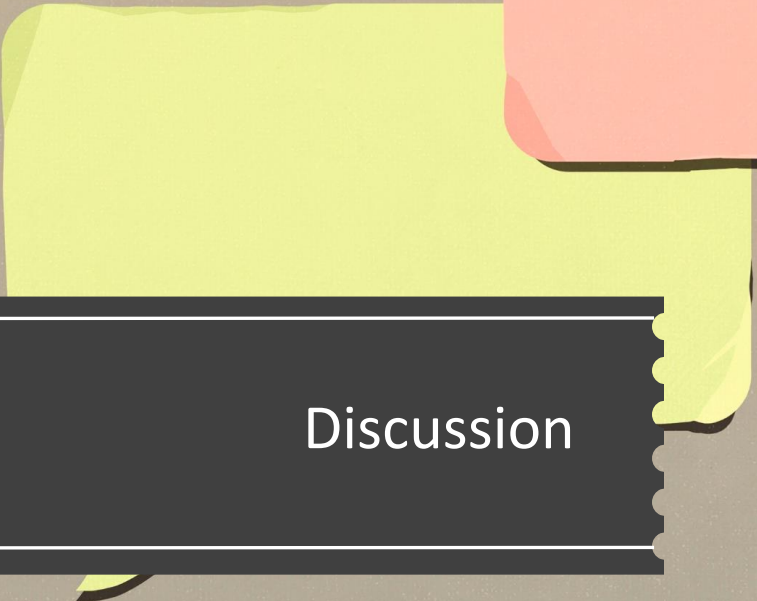
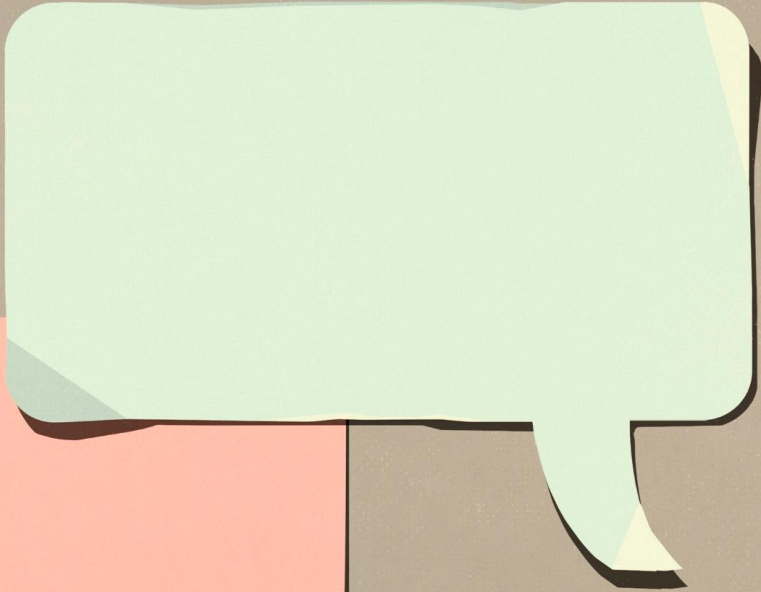
Biofilms participent au microbiote de la fromagerie

Aucun sporulé, biofilms protecteurs ou alimentation?



# Biofilms dans les fromageries

- **Recommandations**
  - Attention à la qualité microbiologique de l'eau
  - Ajouter un action physique (brossage) au nettoyage des endroits avec des surfaces poreuses ou avec structure complexe (ex. valve des cuves)
  - Suivre les recommandations associés aux produits nettoyants
  - Éliminer le plus rapidement possible les résidus laitiers
- **Perspectives**
  - Grâce aux interactions microbiennes, améliorer les connaissances sur les biofilms bénéfiques/protecteurs et les biofilms négatifs



Discussion

# CAUSERIE FROMAGÈRE

CEFRQ



9 mai 2023

De 14h00-15h30

**Application des bactéries lactiques dans les  
aliments : cultures protectrices et  
probiotiques**

**Conférencière : Émilie Desfossés-Foucalt  
Gestionnaire science et technologie, Biena**



# CAUSERIE FROMAGÈRE

CEFAQ



**6 juin 2023**

De 14h00-15h30

**Les effets de la supplémentation lipidique  
de la vache laitière sur les propriétés du  
beurre et du fromage**

**Julien Chamberland, Rachel Gervais et Guillaume  
Brisson**

