



Biofilm e alimentazione - vulnerabilità e soluzioni pratiche



PARTE 1

LE VULNERABILITÀ



Biofilm

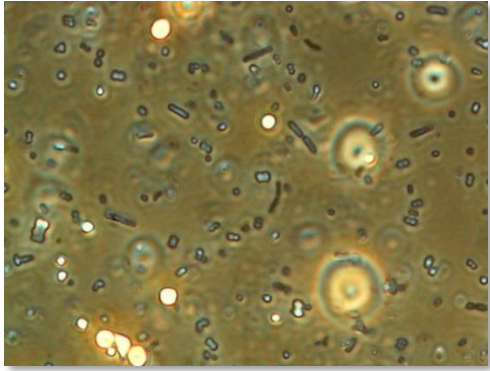
agglomerato di **diversi microrganismi (batteri, funghi, protozoi o alghe)** inclusi in una **matrice** e adeso ad una superficie.

(ROUX & GHIGO, 2006)

Composto da acqua (fino al 97%), matrice extracellulare, microrganismi, canali e pori per permettere il passaggio di acqua, ioni e nutrienti.

Una comunità che coopera per difendersi ed espandersi.

Grande varietà di
microrganismi



Elevata quantità di
nutrienti



Broda

Acqua

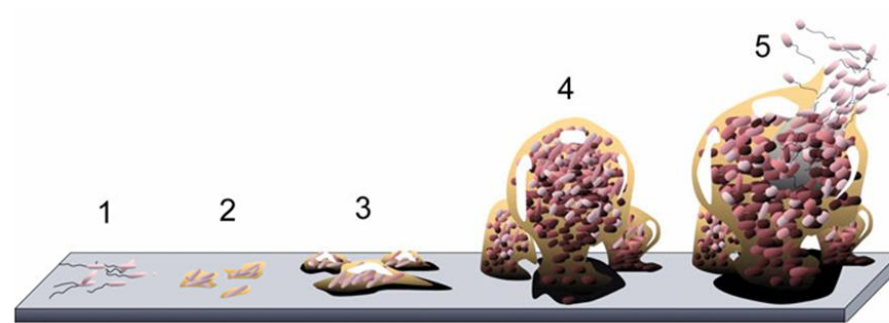


Superfici di
contatto



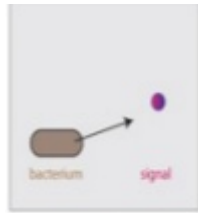
CICLO VITALE DI UN BIOFILM

- 1)**Adesione** di batteri liberi alla superficie di un materiale biologico (reversibile)
- 2)**Aggregazione** di cellule, formazione di micro colonie, escrezione di polimeri per la matrice (l'aggregazione diventa irreversibile)
- 3)**Maturazione**: si forma il biofilm
- 4)**Crescita tridimensionale**, maturazione, protezione dal sistema immunitario dell'ospite e dalle sostanze antimicrobiche
- 5)**Dispersione**: di batteri planctonici, proliferazione



Ciclo di sviluppo di un biofilm (5 fasi) (UNOSSON, 2015)

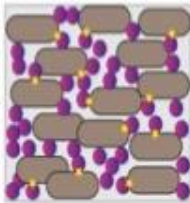
Resistenza dovuta alla comunicazione



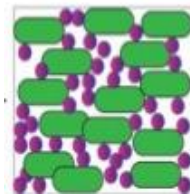
I batteri ricevono uno stimolo



Emissione di molecole segnale



Soglia di concentrazione di messaggi individuati (QUORUM SENSING)



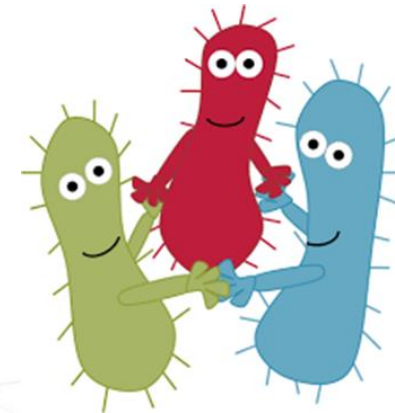
Modifica del programma genetico (gene transfers)

“L’UNIONE FA LA FORZA”

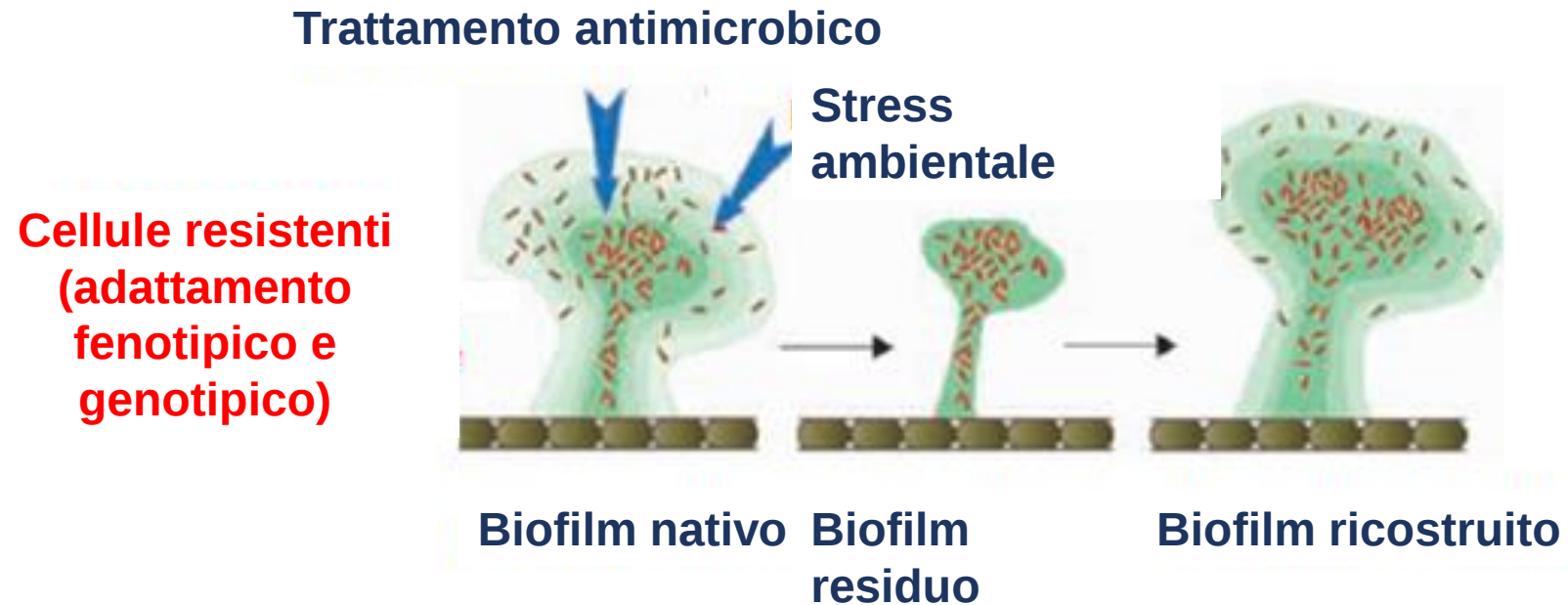
Adattamento al nuovo ambiente = RESISTENZA



NUOVI COMPORTAMENTI NEL BIOFILM



→ Esempio di resistenza: reazione del biofilm agli antibiotici

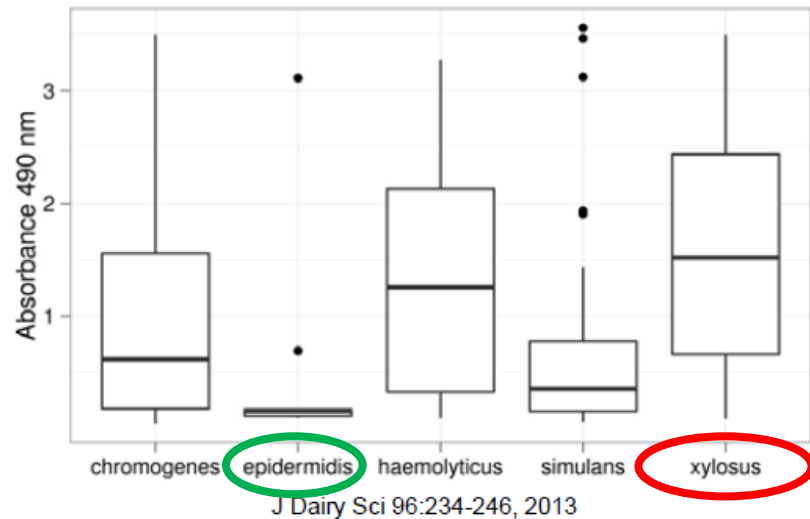


→ Pressione selettiva artificiale

Resistenza agli antimicrobici

- Impatto sull'efficacia del biocida di Staphylococcus spp. Coagulasi Negativo isolati da bovine con mastite
MIC (minimal inhibition concentration) ≠ MBEC (minimal biofilm eradication concentration)

Abilità di formare biofilm



Resistenza a PenicillinaG/Novobiocine

Souches de SCN	CMI	CMEB	X
<i>S. chromogenes</i> 40800059	≤0.5/2	64/256	128
<i>S. chromogenes</i> 40700281	2/8	>1024/ 4096	>512
<i>S. simulans</i> 32300284	≤0.5/2	16/64	32
<i>S. xylosus</i> 41206492	≤0.5/2	8/32	16
<i>S. epidermidis</i> 41500743	≤0.5/2	64/256	128

CMI: concentration minimale inhibitrice (ug/ml)

CMEB: concentration minimale pour éradiquer un biofilm (ug)

23

Resistenza ai disinfettanti

- La penetrazione è influenzata
 - Matrice multistrato con EPS

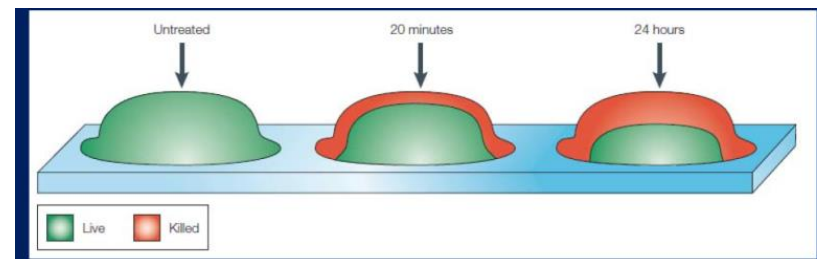


Table 2. Effect of disinfectants on the planktonic cells after treatment for 10 minutes

Disinfectants	Microorganisms					
	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>	
	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b
Iodine	0 ± 0 (3) ^c		0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)	
Biguanide	0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)	
Quaternary ammonium	0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)	
Peracetic acid	0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)	
Sodium hypochlorite	0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)		0 ± 0 (3)	
Positive control ^d	5.4 ± 0.1 (3)		5.6 ± 0.1 (3)		5.6 ± 0.2 (3)	

^a Mean, log CFU/cm²

^b SD, standard deviation

^c Numbers in parentheses indicate number of experiments

^d Positive control, biofilm cells not treated with disinfectants

Resistenza ai disinfettanti

- La penetrazione è influenzata
 - Matrice multistrato con EPS

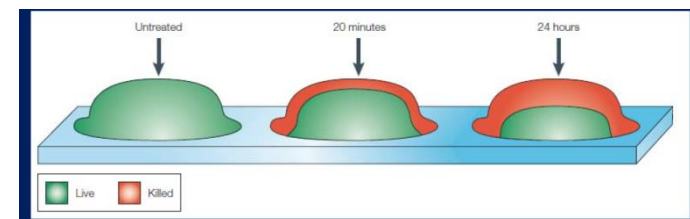


Table 1. Effect of disinfectants on biofilm cells after treatment for 10 minutes

Disinfectants	Microorganisms					
	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>	
	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b	Mean ^a	SD ^b
Iodine	2.4 ± 1.1	(3) ^c	2.0 ± 0.0	(3)	0.8 ± 1.2	(3)
Biguanide	3.3 ± 1.2	(3)	2.9 ± 0.8	(3)	2.2 ± 0.5	(3)
Quaternary ammonium	2.8 ± 2.5	(3)	1.4 ± 0.4	(3)	1.7 ± 0.5	(3)
Peracetic acid	0.7 ± 0.7	(3)	1.1 ± 0.1	(3)	2.1 ± 0.3	(3)
Sodium hypochlorite	0.2 ± 0.3	(3)	1.0 ± 0.0	(3)	0.3 ± 0.3	(3)
Positive control ^d	5.9 ± 0.8	(3)	6.3 ± 0.6	(3)	4.7 ± 0.4	(3)

^a Mean, log CFU/cm²

^b SD, standard deviation

^c Numbers in parentheses indicate number of experiments

^d Positive control, biofilm cells not treated with disinfectants

Aumento della resistenza a prodotti antimicrobici (antibiotici, disinfettanti)

→ I batteri nei biofilm sono da **10 a 1000** volte più resistenti dei batteri planctonici

Il biofilm e la broda – punti di contatto

VASCA



TUBI



TROGOLO



Biofilm nella broda

Segni visibili e valutazione del biofilm



Colore scuro = flora sbilanciata nel biofilm

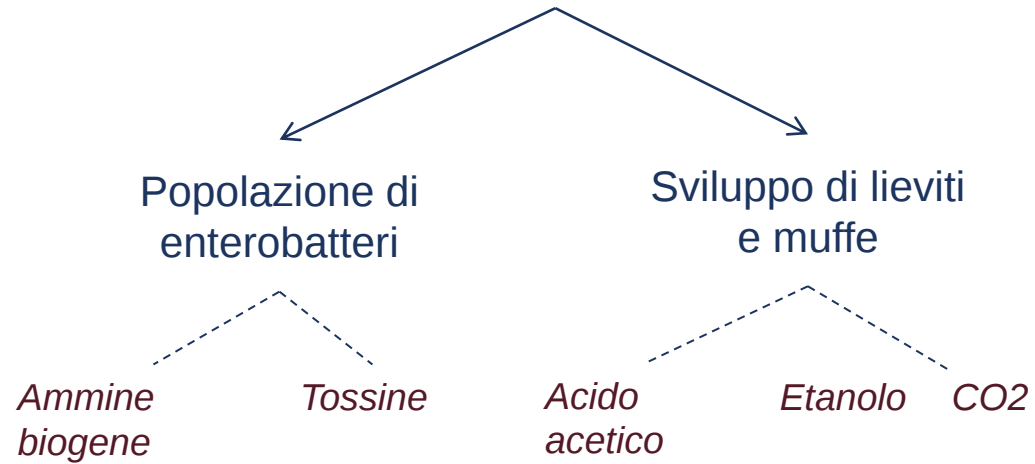
BIOFILM NEGATIVO



Colore bianco = principalmente batteri lattici nel biofilm

BIOFILM POSITIVO

BIOFILM NEGATIVO



IL BIOFILM INFLUENZA L'ALIMENTO

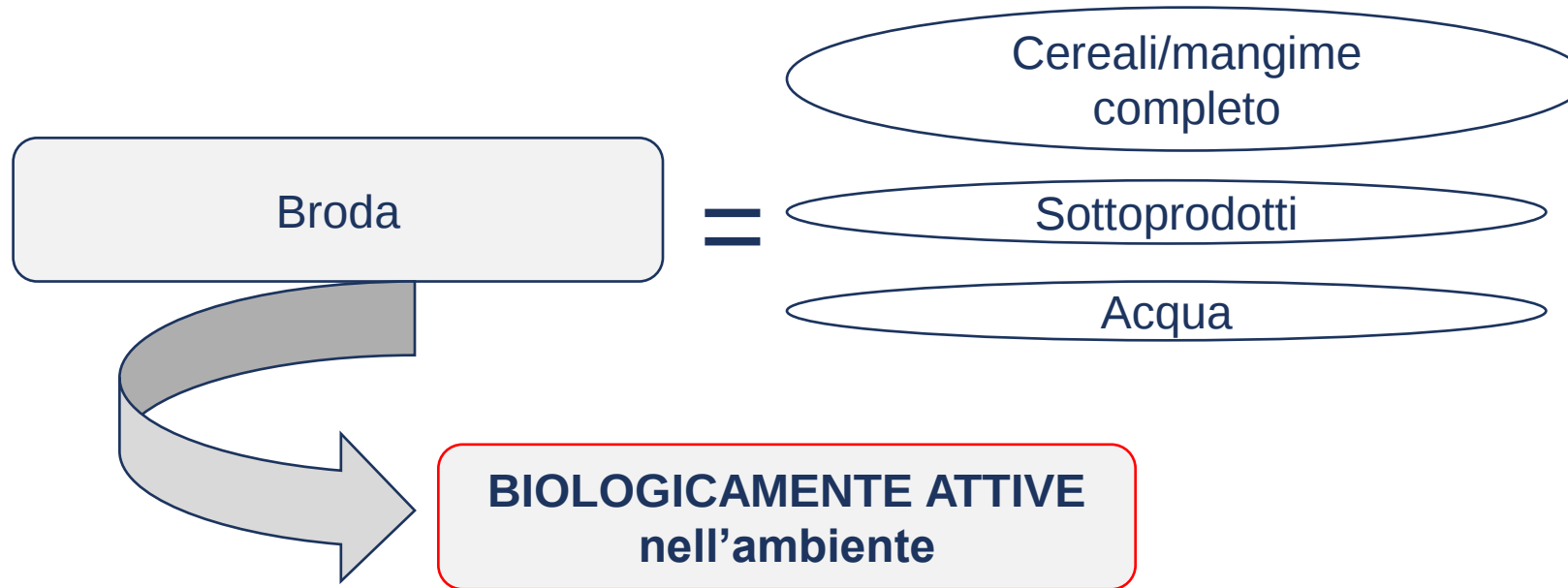
Rischio di malattie
(es: diarrea)

Ridotta appetibilità



Ammine biogene

- prodotte da alcuni ceppi di batteri, principalmente enterobatteri.
- Negli umani → riconosciuta tossicità.



- **Che problemi possiamo aspettarci?**

Ammine biogene/istamina: background in umana

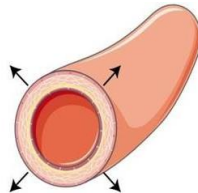
Istamina = neurotrasmettitore
naturalmente presente nel nostro
organismo



Risposte durante fenomeni infiammatori e allergici



Vasodilatazione e
caduta della
pressione sanguigna



Contrazione della
muscolatura liscia



Rilascio di succo
gastrico



▪ (Anses, 2012; Laroche D., 2006)

Tipologie di ammine biogene

- Differenti strutture chimiche delle ammine biogene (cf. table) (Y. Le Treut, 2009).
- Possono essere anche classificate in base al numero di gruppi amminici (monoammine, diammine...)

Gruppo	Amminoacido di origine	Ammina biogena corrispondente
Aromatici	Istidina	Istamina
	Triptofano	Triptamina Serotonina
	Tirosina	Tiramina Octopamina
Alifatici	Lisina	Cadaverina
	Cisteina	Cisteamina
	Arginina	Spermidina
		Putrescina Spermina

Ammine biogene nella broda dei suini

APPROCCIO PRATICO



Osservazioni in allevamento (dati interni di LAN):

Sintomi



Scarsa ed eterogenea
assunzione alimentare;
sindromi infiammatorie acute
con morti improvvise



Morti improvvise nei
suini, Belgio



Laminiti nelle scrofe

Risultati delle analisi sulla broda

> 1000 ppm AB

Crema di piselli fermentati
>50 000 ppm AB (cattivo
odore)

> 1000 ppm AB

Questi sintomi non possono essere direttamente collegati alla presenza di ammine biogene ma pongono **alcune domande riguardo le implicazioni sulle performance zootecniche**

Ammine biogene nella broda dei suini

APPROCCIO PRATICO



■ Risultati: analisi di ammine biogene nella broda

Biogenic Amines presence in liquid feed, by-products, ... (in ppm of DM)

Feed	Putrescine	Tyramine	Cadaverine	Serotonin	Histamine	Agmatine	Betaphenyl ethylamine	Spermidine	Tryptamine	Spermine	Total	Standard deviation	N
Complete feed	7	2	57	0	11	2	1	17	5	2	103	108	12
By-products	141	8	616	0	74	2	2	39	60	8	943	861	3
High-moisture corn	101	68	211	0	69	3	2	25	45	3	492	484	18
Average	70	39	192	0	48	3	2	23	31	3	391	490	33
Min	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	11		
Max	310	155	1182	0	289	8	7	69	131	17	1785		

**LA PRESENZA DI AMINE BIOGENE NELLA BRODA È REALTÀ!
LE QUANTITÀ SONO MOLTO VARIABILI**

Ammine biogene nella broda dei suini

Nei tubi e nella vasca di recupero

- **Variazione** di 10 AB testate tra 128 e 866 ppm
- Media: **440 ppm** = il valore di AB È MOLTO PIÙ ALTO CHE IN MANGIATOIA
- Dominanza di tiamine e putrescine



Ammine biogene nella broda dei suini

In più la «tossicità» delle AB ha ulteriori effetti negativi:

- **Metaboliti** prodotti → **non utilizzabili** dall'animale
- **AA degradati** → perdita di nutrienti

AB= odore e cattivo gusto



<palatabilità < ingestione alimentare



Riduzione delle performance



PARTE 2

SOLUZIONI PRATICHE

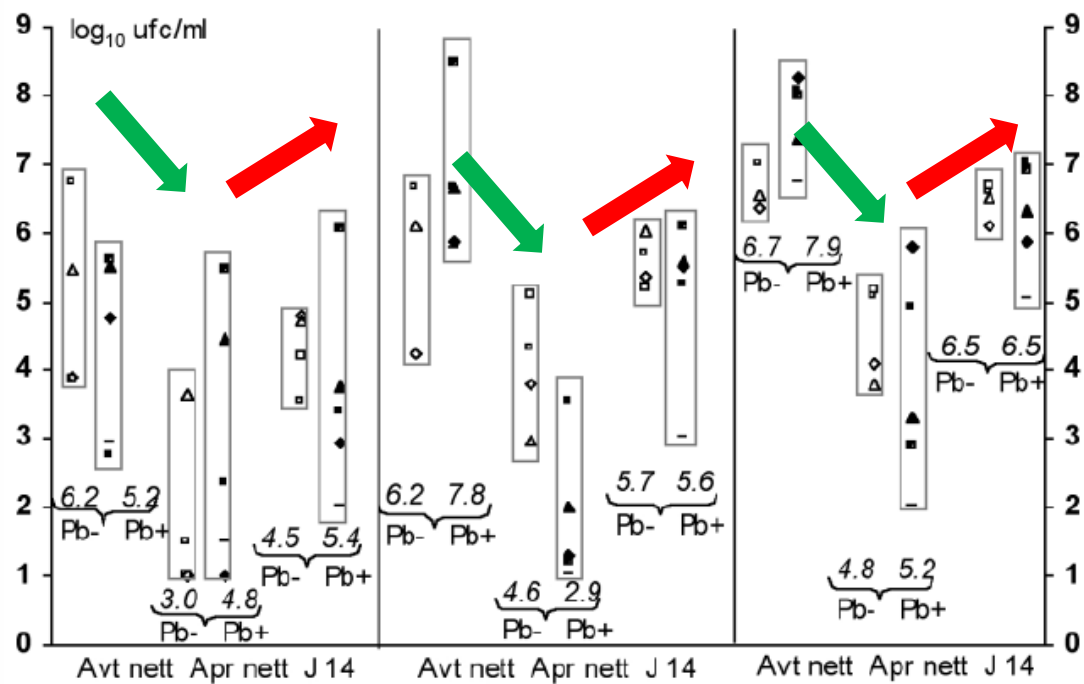


LA PULIZIA DELL'IMPIANTO - esempio

- Si calcola quanta acqua serve a saturare l'impianto a valvole chiuse
- Dosare il detergente per una diluizione all'1.5%
- Azionare la pompa e lasciar circolare per 90 minuti
- Spegner la pompa, e permettere il tempo di contatto più lungo possibile
- Buttare via l'acqua di lavaggio e risciacquare con una quantità di acqua pari a 2-3 volte la capacità dell'impianto (ci dovrebbero volere attorno alle 2 ore, si può controllare con un pH metro che non ci siano più tracce di detergente)
- Scartare anche quest'acqua
- Specialmente all'inizio, ripetere anche 2-3 volte in 2 settimane

Quanto dura l'effetto?

Flora totale acqua di recupero, prima, dopo e 14 giorni dalla pulizia dell'impianto



Pb - = normali

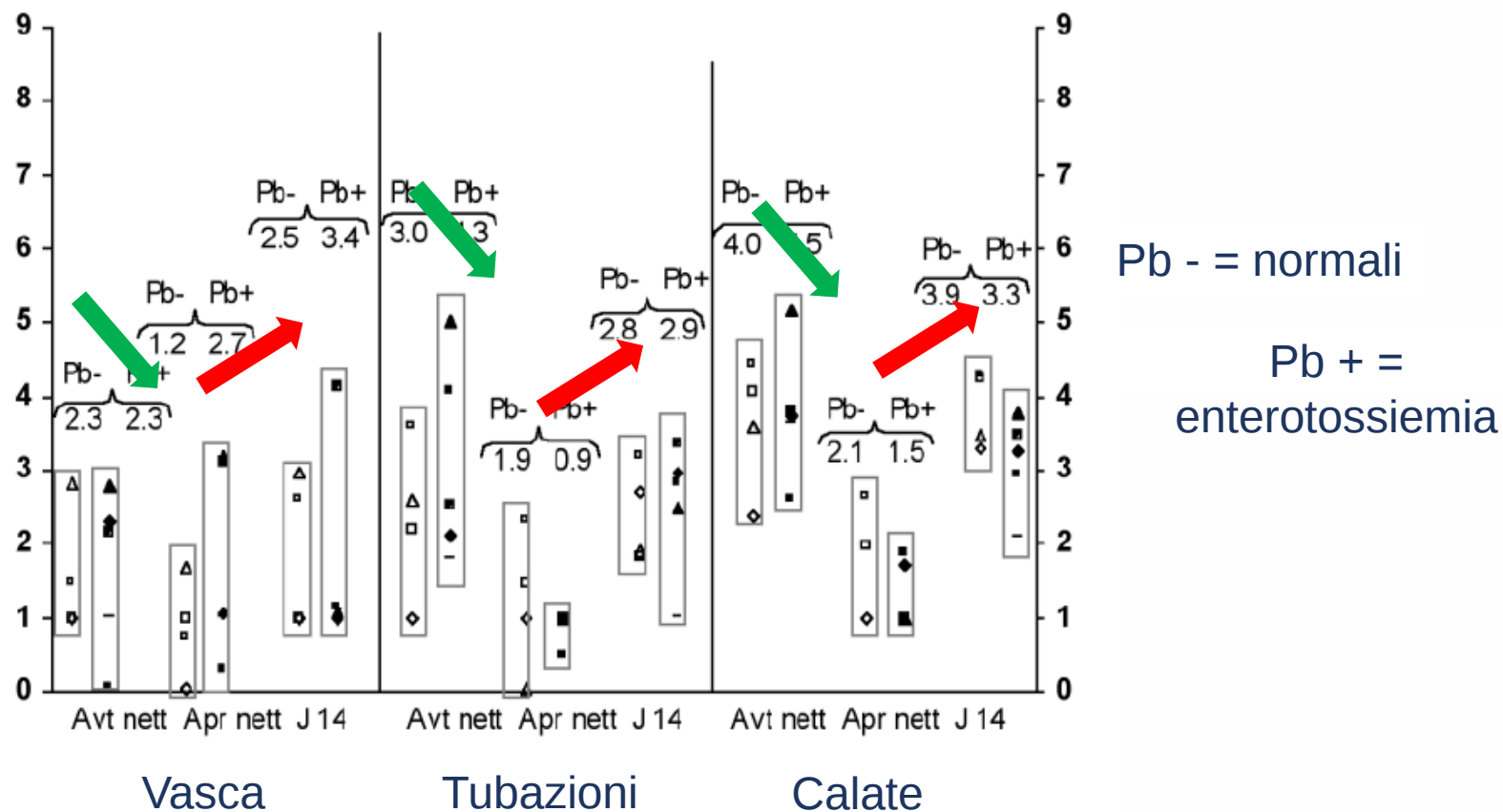
Pb + =
enterotossemia

Vasca

Tubazioni

Calate

Coliformi Totali acqua di recupero, prima, dopo e 14 giorni dalla pulizia dell'impianto



P. Acidilactici - **BACTOCELL**

BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

- Batterio omolattico, converte zuccheri complessi in acido lattico L+
- Selezionato e ad alta concentrazione



Controllo delle ammine biogene nella broda: CASI PRATICI

► Peter Brooks → Esperimento con 4 campioni di broda:

Controllo (non
inoculata)

E. Coli

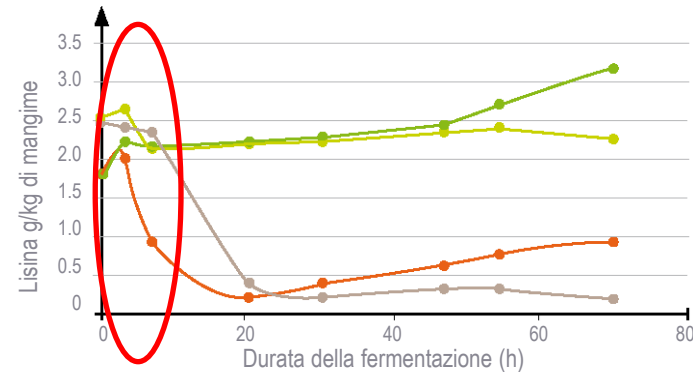
LAB

LAB + E. Coli

► Livello di lisina misurato in ciascun campione nelle diverse fasi delle fermentazioni.

► **RISULTATI:**

— Controllo + E. coli
— Controllo
— Pediococcus a. + E. coli
— Pediococcus a.



Stewart J. Niven, J. Beal, P. Brooks, Animal Feed Science and Technology, 2006

BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

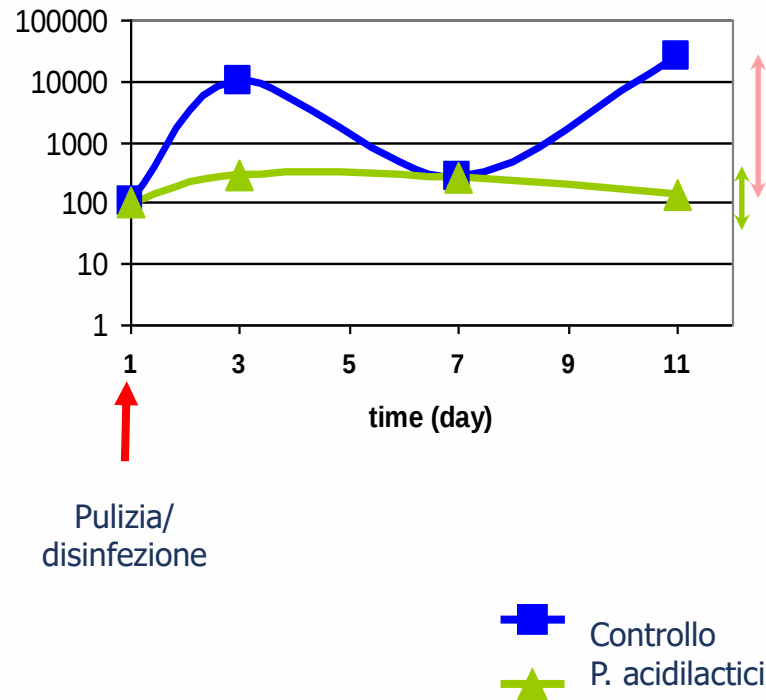
Il **Pediococcus acidilactici** limita lo sviluppo di coliformi patogeni e mantiene un corretto livello di lisina nella broda

L'effetto di **BACTOCELL**

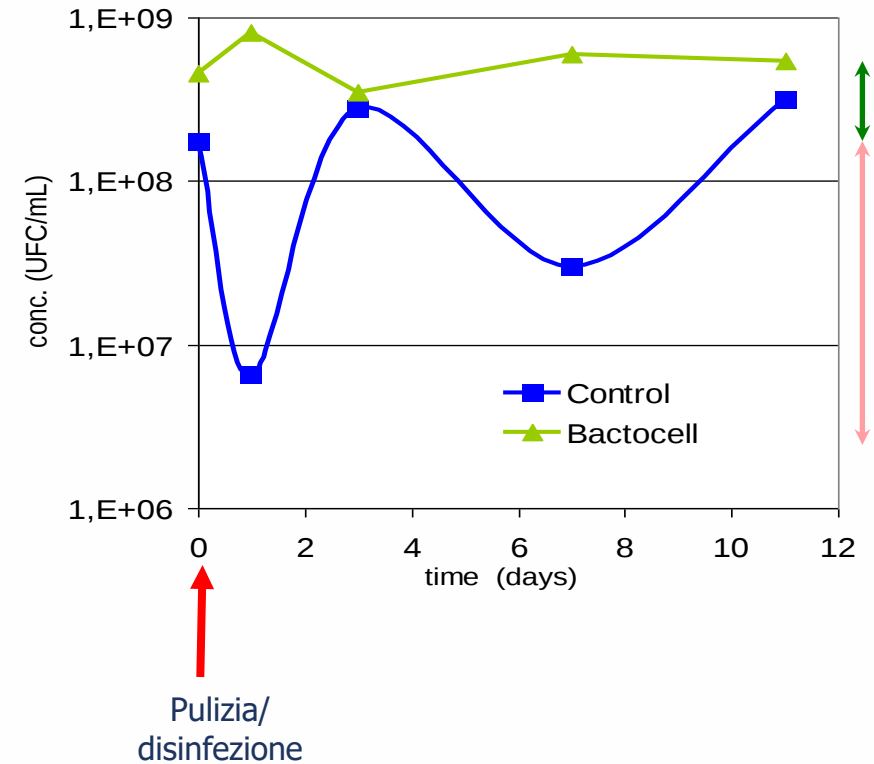
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

Totale Coliformi (0-11gg)

Variazione rispetto al 1° giorno



FLORA LATTICA (0-11GG)



Farm studies, South West, France, 2001.

Effetti del *Pediococcus acidilactici* sul biofilm

Trans. Tianjin Univ. (2017) 23:70–77
DOI 10.1007/s12209-016-0016-z



RESEARCH ARTICLE

Pediococcus Acidilactici Inhibit Biofilm Formation of Food-Borne Pathogens on Abiotic Surfaces

Xiqian Tan¹ · Ye Han¹ · Huazhi Xiao¹ · Zhijiang Zhou¹

Received: 12 December 2015 / Revised: 25 February 2016 / Accepted: 2 March 2016 / Published online: 23 December 2016
© Tianjin University and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

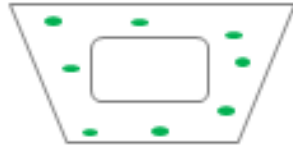
Abstract In this study, we aimed to examine the inhibitory effect of PA003, a *Pediococcus acidilactici* that produces lactic acid and antimicrobial peptides pediocin, on pathogenic biofilm formation on abiotic surfaces. PA003 and pathogens (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) were used to evaluate auto-aggregation, hydrophobicity, biofilm formation and biofilm formation

Introduction

Escherichia coli, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, which are occasionally found in food processing facilities, are considered food-borne pathogens that pose possible risks in food safety and toward human health [1]. These bacteria cause human diseases when they are ingested

Effetti di *Pediococcus acidilactici* sul biofilm

Prova 1: Esclusione



Inserimento di una **superficie in PVC** in soluzione **inoculata con PA** in provette da 50ml (biofilm positivo)



Immersione in **300 ml di acqua distillata sterile (5s)**



Immersione in nuove provette da 50 ml con una **soluzione da 30 ml** contenente **10^8 CFU/ml** di **cellule patogene**

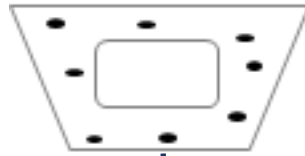


**25 °C – 6
giorni**

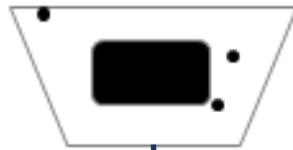
?

Effetti di *Pediococcus acidilactici* sul biofilm

Prova 2: Sostituzione



Inserimento di una **superficie in PVC inoculata con una miscela di patogeni** in provette da 50 ml (biofilm negativo)



Immersione in **300 ml di acqua distillata sterile (5s)**



Immersione in nuove provette da 50 ml con una **soluzione da 30 ml contenente 10^8 CFU/ml di cellule di PA**

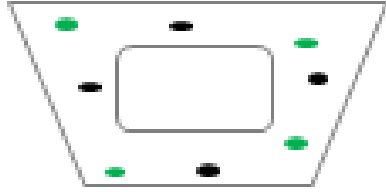


25 °C – 24h

?

Effetti di *Pediococcus acidilactici* sul biofilm

Prova 3: Competizione



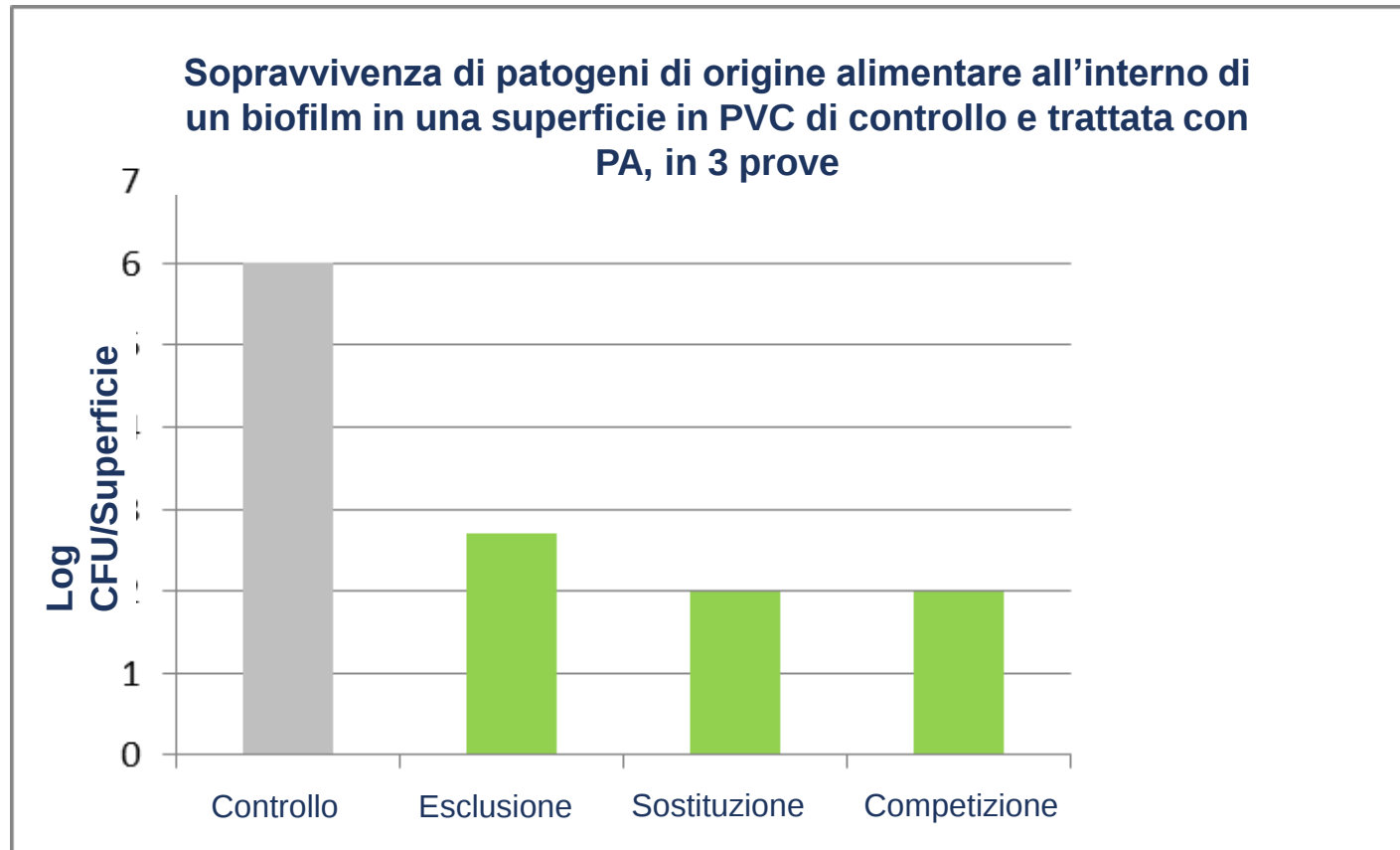
?

Co-cultura da 10^8 CFU/mL di PA e una miscela di patogeni in provette da 50ml (quale biofilm si stabilirà?)

25 °C – 6
giorni

→ **Conta batterica**

Effetti di *Pediococcus acidilactici* sul biofilm



In ciascun metodo, l'inoculazione di PA permette di ridurre il numero di cellule patogene nel biofilm finale di 4 log CFU/superficie

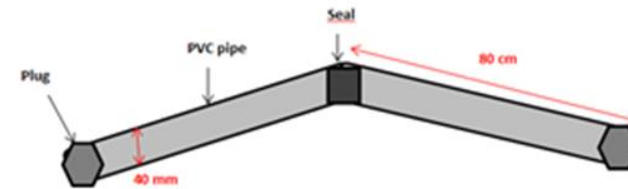
PROVA: COSTITUZIONE DI UN BIOFILM ARTIFICIALE

Installazione del sistema

■ Sistema chiuso

Per rappresentare i tubi lungo tutto il circuito di distribuzione

- Due tubi in PVC da 80 cm PVC connessi tramite giunzione (8 tubi storti con il volume di 2 litri):
 - Broda inoculata con *P. acidilactici*
 - Broda controllo
- Ogni tubo è chiuso alle due estremità con un tappo



Installazione del sistema

■ Sistema aperto

Per rappresentare la fine del circuito di distribuzione, l'apertura in mangiatoia

- Utilizzati due tubi dritti
 - Uno per la broda inoculata (tagliati 25 cm ogni settimana per l'analisi del biofilm)
 - Uno per la broda di controllo (tagliati 25 cm ogni settimana per l'analisi del biofilm)
- Un'estremità di ogni tubo viene chiusa con un tappo



Diffusione della broda nel circuito

- Broda controllo (tubi grigi) e broda inoculata (tubi verdi)

1

Riempimento



2

Tempo di attesa: 5 minuti



5 min

Diffusione della broda nel circuito

3

Svuotamento



4

Risciacquo dei tubi
sigillati (200ml di H₂O)



**Procedura ripetuta due
volte al giorno PER 3
SETTIMANE**

FLORA LATTICA

Controllo

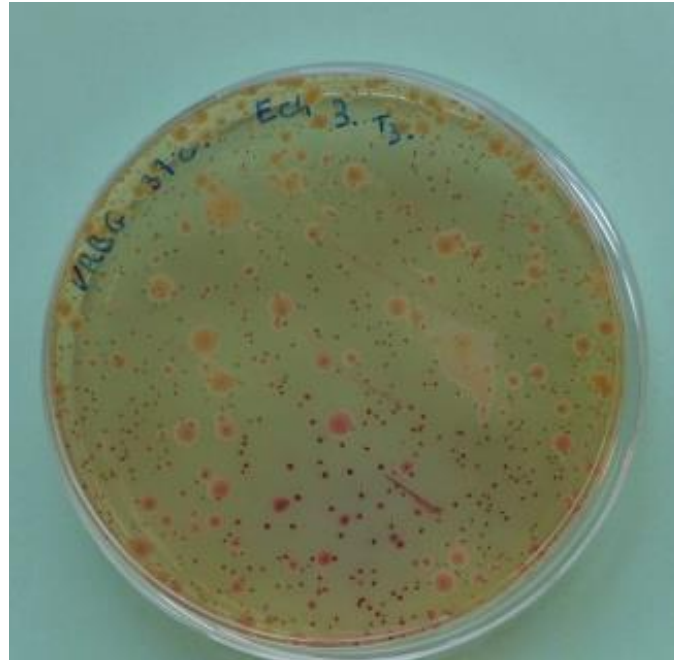
BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI



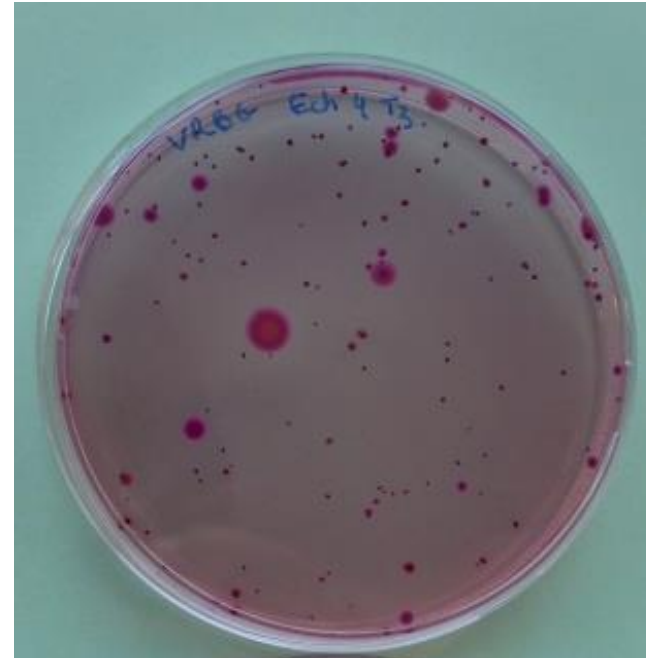
- ✓ Ambiente non totalmente selettivo - alcuni *E. faecium* potrebbero crescere.
- ✓ Colonie più omogenee e "Pediococcus-simili" sulla piastra *Pediococcus acidilactici*
- ✓ **CONTROLLO DELLA POPOLAZIONE?**

ENTEROBATTERI

Tubi
risciacquati



Controllo



BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

✓ -88%

✓ Nei tubi non risciacquati, i risultati sono illeggibili.

COLIFORMI

*Tubi non
risciacquati*



Controllo



BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

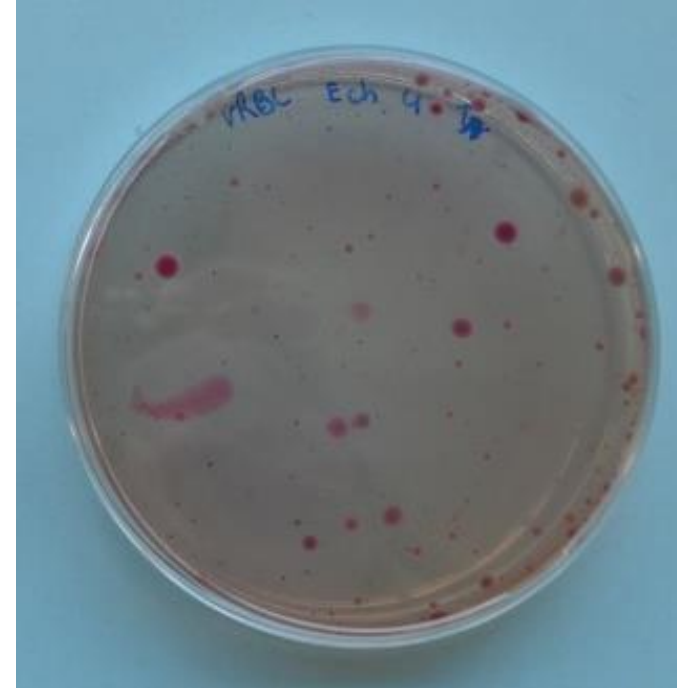
✓ -43%

COLIFORMI

Tubi
risciacquati



Controllo

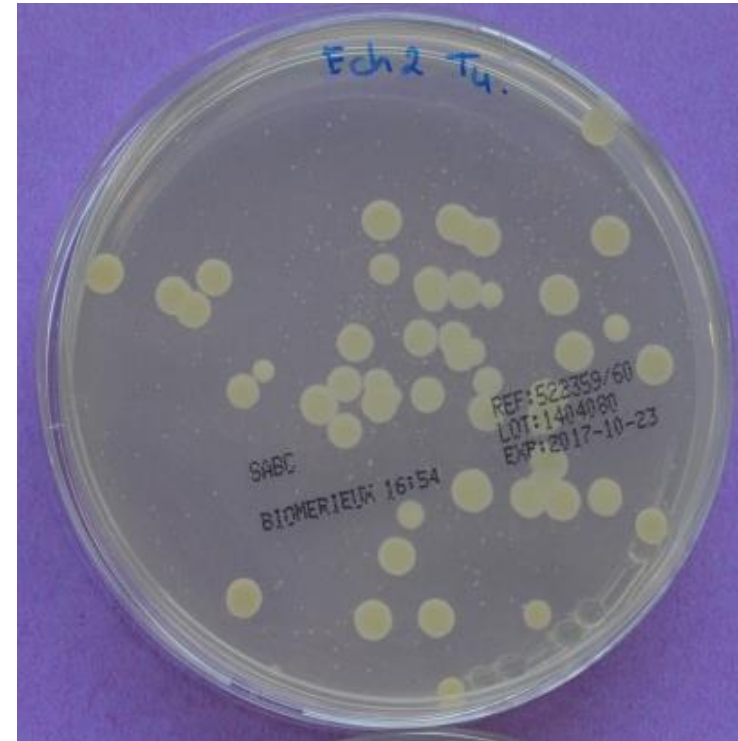


BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

✓ -60%

LIEVITI E MUFFE

*Tubi non
risciacquati*



Controllo

BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

✓ -75%

LIEVITI E MUFFE

Tubi
risciacquati



Controllo



BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

✓ -41%

Effetti di Bactocell sul biofilm

- **Prova:** costituzione di un biofilm artificiale con/senza INOCULO BATTERICO

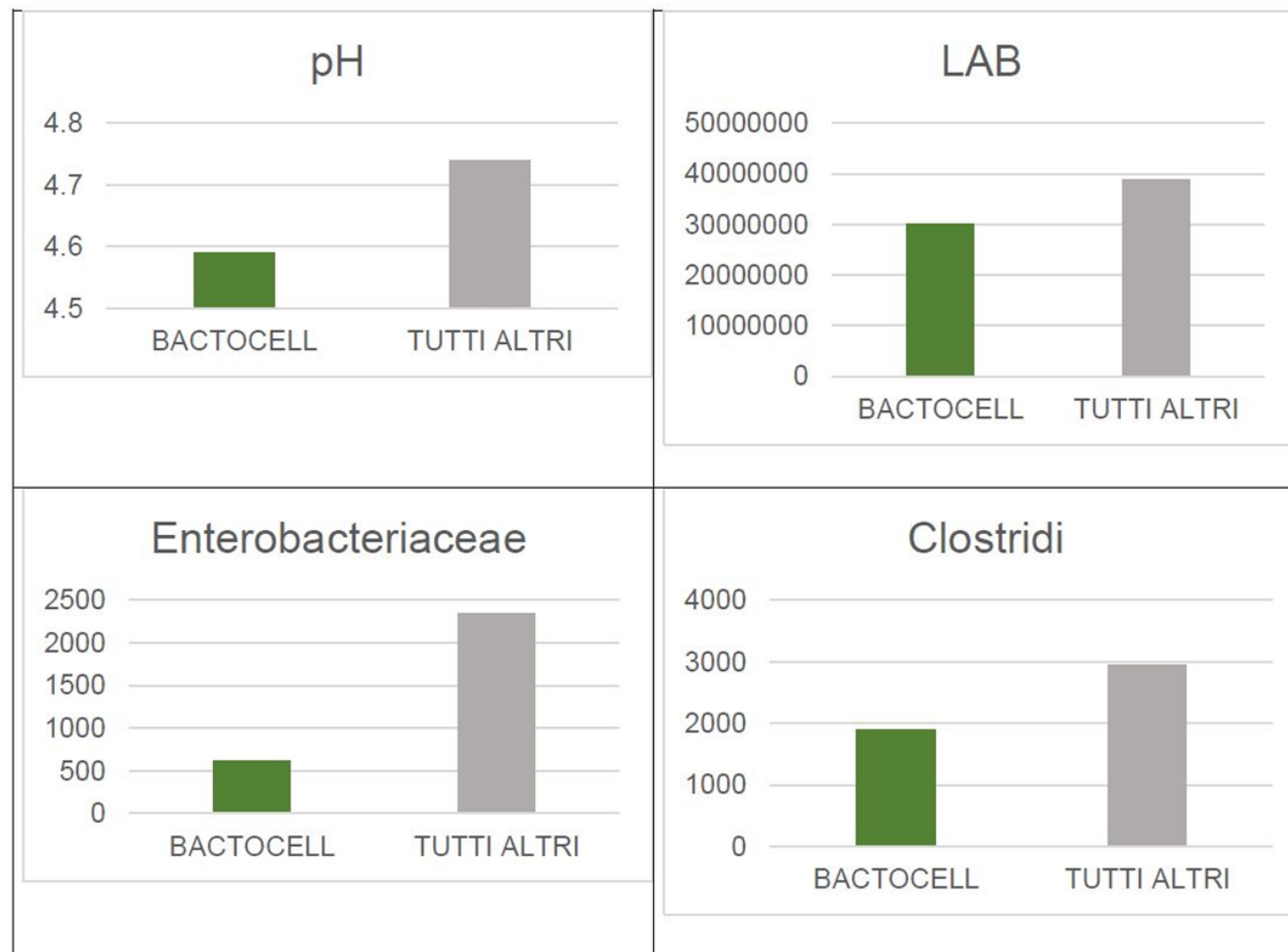
	Tubi non risciacquati		
Famiglia di microrganismi	Controllo	BACTOCELL	Riduzione dei microrganismi
Coliformi	3.50E+08	2,00E+08	43%
Enterobatteri	1,00E+07		
Lieviti e muffe	1.86E+08	4.65E+07	75%
	Tubi risciacquati		
Famiglia di microrganismi	Control	BACTOCELL	Riduzione dei microrganismi
Coliformi	2,06E+05	8,30E+04	60%
Enterobatteri	1,21E+07	1,41E+06	88%
Lieviti e muffe	1,89E+05	1,12E+05	41%

- Complessivamente, è stata riscontrata una popolazione abbondante:
 - 4.8E+9 CFU/g di sostanza organica
 - 2.5E+7 CFU/20cm² di superficie risciacquata
- La flora è controllata e nuovamente bilanciata nel biofilm grazie all'utilizzo dell'inoculo batterico (minor carica di enterobatteri e coliformi): differenze tra 1 e 2 log grazie ai benefici del trattamento.

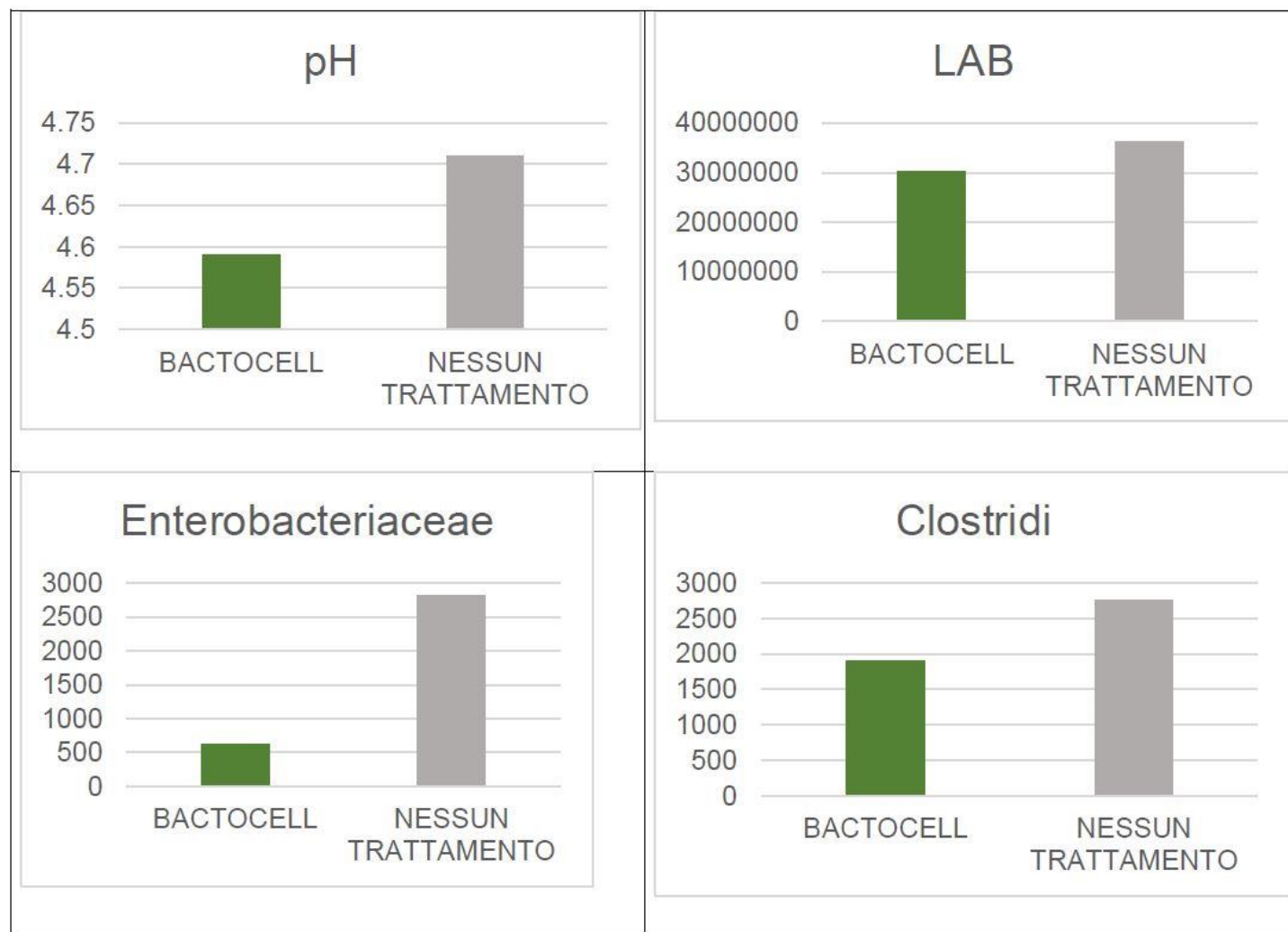
INDAGINE DAL CAMPO

- 42 campioni da allevamenti in Lombardia e Emilia Romagna
- Analisi microbiologica dell'acqua di recupero
- Varietà di ingredienti (tra cui pastone, siero)
- Utilizzatori Bactocell, acidificanti e brode non trattate

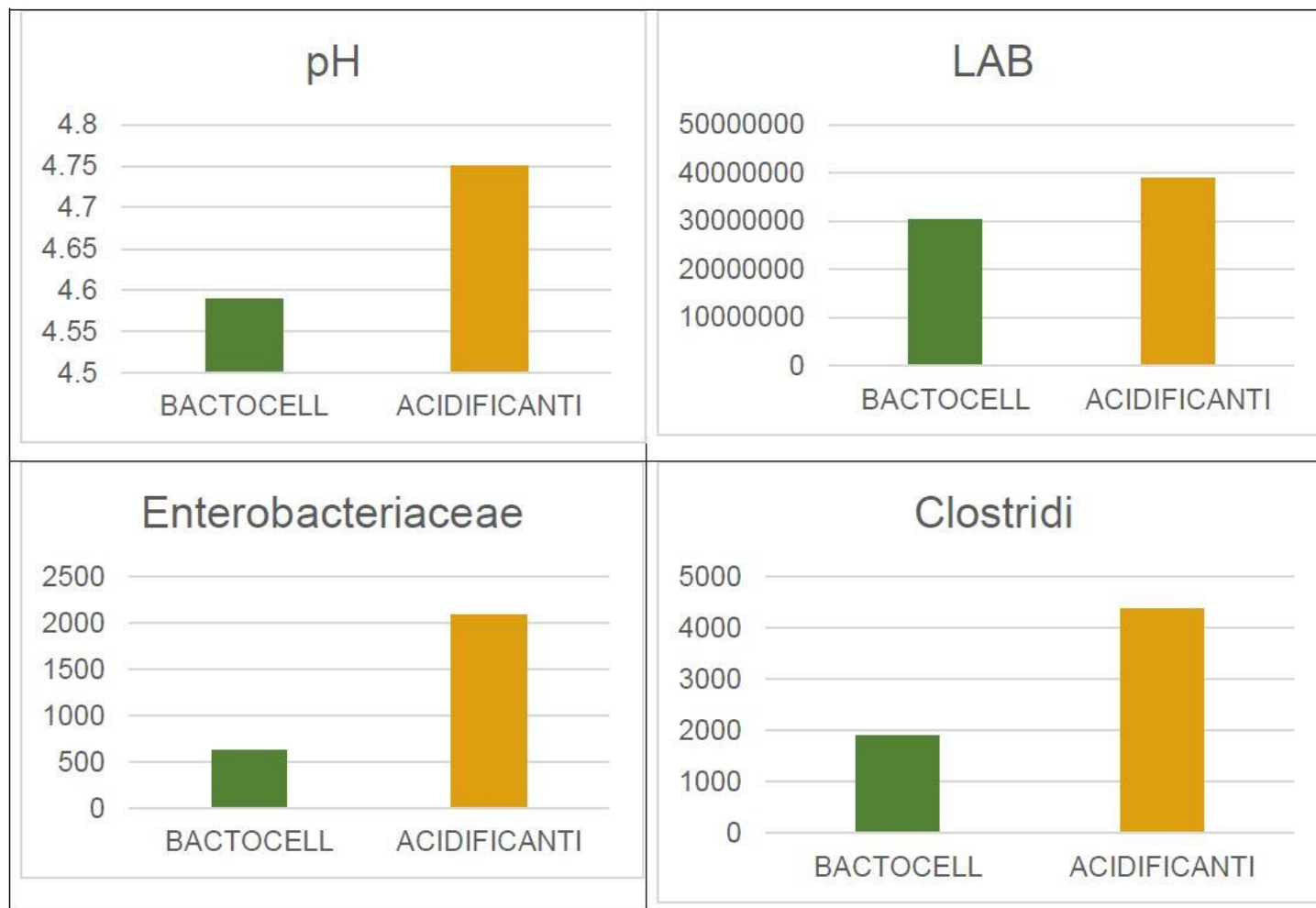
1. TUTTI GLI INGREDIENTI - BACTOCELL vs TUTTE LE ALTRE BRODE



2. TUTTI GLI INGREDIENTI - BACTOCELL vs NESSUN TRATTAMENTO

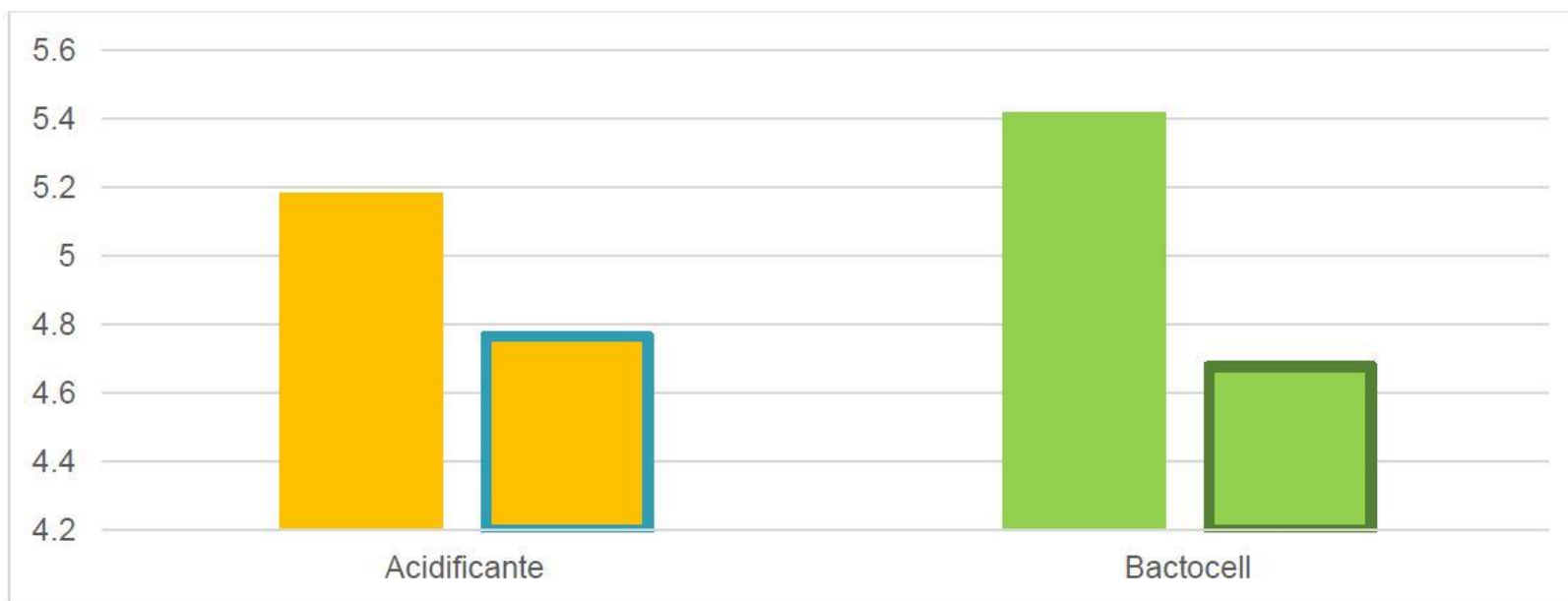


3. TUTTI GLI INGREDIENTI - BACTOCELL vs ACIDIFICANTI



CAPACITÀ DI INFLUENZARE IL PH RISPETTO A QUELLO DELLA BRODA FRESCA

	Media di pH BRODA	Media di pH	DIFFERENZA
Acidificante	5.18	4.77	-0.42
Bactocell	5.42	4.68	-0.74



Autorizzazioni EU - 2023/53 4 Gennaio 2023

Identification number of the additive	Additive	Composition, chemical formula, description, analytical method	Species or category of	Maximum age	Minimum content	Maximum content	Other provisions	End of period of authorisation
					CFU of additive/kg of fresh material			
Category: technological additives. Functional group: hygiene condition enhancers (reduction of the growth of coliforms).								
4d1712	<i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-4622	Preparation of <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-4622 containing a minimum of 1 × 10 ¹⁰ CFU/g Solid form	species		1 × 10 ⁸		1. In the directions for use of the additive and pre-mixtures, the storage conditions shall be indicated. 2. The additive shall be used only in mash compound feeds intended for the preparation of liquid feed on the farm and/or in solid feed materials intended for the preparation of liquid feed on the farm.	24.1.2033

Identification number of the additive	Additive	Composition, chemical formula, description, analytical method	Species or category of	Maximum age	Minimum content	Maximum content	Other provisions	End of period of authorisation
					CFU of additive/kg of complete feed with a moisture content of 12 %			
Category: technological additives. Functional group: acidity regulators.								
4d1712	<i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-4622	Preparation of <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-4622 containing a minimum of 1 × 10 ¹⁰ CFU/g Solid form	All animal species	-	1 × 10 ⁹	-	1. In the directions for use of the additive and pre-mixtures, the storage conditions shall be indicated. 2. The additive shall be used only in mash compound feed intended for the preparation of liquid feed on the farm and/or in solid feed materials intended for the preparation of liquid feed on the farm.	24.1.2033

BACTOCELL
BATTERI LATTICI PER MONOGASTRICI

Conclusioni

- La broda ha vantaggi gestionali e di performance.
- Le fermentazioni dipendono da diversi fattori ma i più importanti sono **composizione** e **qualità microbiologica** dei cereali e **il biofilm**.
- I **biofilm negativi** possono essere responsabili di effetti indesiderati nei suini (patologie, produzione di composti mal odoranti)
- **Obiettivo: ottenere un biofilm positivo controllando la flora della broda quindi del biofilm**
- Una corretta pulizia e l'inoculazione con **Bactocell** permettono di stabilire un biofilm positivo ed ottimizzare le performance produttive in allevamento

- **NOTICE:** This presentation and its contents including any research data is, unless otherwise specifically attributed, the intellectual property of Lallemand Animal Nutrition, a trading division of Lallemand Inc (“Lallemand”) and may not be copied or reproduced or distributed, in whole or in part, without the prior consent of Lallemand.
- **DISCLAIMER:** Although reasonable care has been taken to ensure that any facts stated in this presentation are accurate and that any opinions or advice expressed are fair and reasonable, no warranty is given as to the accuracy, completeness or correctness of the information. To the extent permitted by law, Lallemand, its officers, employees and agents shall not be liable for any loss suffered, howsoever arising, from the use by a third party of the information, advice or opinions contained within this presentation. This presentation does not constitute an offer, invitation, solicitation or recommendation with respect to the purchase of Lallemand products and information within, including the specifications of products, may be amended or withdrawn without prior notice. This presentation may contain information on products which are not available for sale nor are approved for use within certain jurisdictions.