

## Positive biofilms to guide surface microbial ecology



*In farm buildings all surfaces — floors, walls, ceilings and equipment — are colonized by biofilms.*

**Increasing emphasis is put on the role and management of microbial biofilms in farm buildings, particularly in the context of reducing on-farm antimicrobial usage while safeguarding the animal microbial environment. A comprehensive review has just been published in the journal *Biofilm*.**

Scientific review

*By Virgile Guéneau, Lallemand Animal Nutrition and INRAE*

The scientific review provides an overview of the envisioned modes of action of positive biofilms used on livestock building surfaces and the resulting criteria for the selection of the appropriate micro-organisms for this specific application. The authors further discuss the pros and cons of such a biosecurity approach as well as its influence along the food chain, from farm-to-fork.

### **Biofilms**

A biofilm is defined as a “spatially organised community of micro-organisms fixed to a surface”. It represents the most prevalent mode of life for micro-organisms in nature and is omnipresent in all environments. Biofilms secrete a protective extracellular matrix which can represent around 85% of the biofilm biomass. In farm buildings all surfaces — floors, walls, ceilings and equipment — are colonized by biofilms. They can be harmless, positive or negative for the animals if they contain pathogens. Before a new batch of animals enters the building, cleaning and disinfection (C&D) are necessary. However, surfaces do not remain sterile. Micro-organisms carried over from the animal environment and the new animals themselves, quickly start recolonizing the surfaces, forming biofilms again.

### **The rationale for positive biofilm**

Among internal biosecurity measures to limit the persistence and proliferation of pathogenic bacteria in livestock buildings, C&D protocols are applied between each breeding cycle using, for example, biocidal products. However, several studies have shown that such chemicals may not be completely effective against biofilms and only allow elimination of part of the microbiota present on farm building surfaces.

It has been shown in avian farms that C&D protocols are not totally effective in eradicating the residual pathogens responsible for cross-contamination between different batches of animals, such as *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*. This reduction in the efficiency of C&D is directly associated with the formation of biofilms by these surface-associated communities. While various anti-biofilm approaches have been envisaged, none of these biosecurity methods is universal and combined strategies hold the most potential.

A very promising approach appears to be guiding the ecology of a surface by settling positive biofilms that will colonize and physically protect the surface from pathogen multiplication: the positive biofilm strategy (Figure 1). Positive biofilms are already used in many sectors, such as food and healthcare, and show very promising results in farm building applications when used to complement C&D protocols.

### **How do positive biofilms work?**

Four major complementary mechanisms have been described to explain the modes of action of positive biofilms on farm building surfaces (Figure 2).

1. Anti-adhesive effect: the presence of the positive biofilm itself, or some molecules it produces, can limit the initial adhesion of pathogens on the surface.
- 2 & 3. Spatial and nutritional competition: by occupying the space and consuming the available nutritional resources, the positive biofilm can limit the proliferation of undesirable bacteria.
4. Microbial interference: through the secretion of specific effectors, such as organic acids or antagonistic molecules, positive biofilms can create an unfavourable environment to help mitigate the presence of undesirable micro-organisms on the surface.

### **Selecting the best candidate**

Advanced screening and metagenomic techniques are used to select the best bacterial strains able to form positive biofilms on farm building surfaces and help keep pathogens at bay. Even where the selection starts in the laboratory, scientists ensure that the bacteria selected are adapted to farm ecobiological and physico-chemical conditions. Most products available on the market are mixtures of lactic acid bacteria (LAB) and *Bacillus* species. Synergy has been shown between these species. For example, it has been observed that biofilm formed by *Bacillus subtilis* protects LAB from desiccation.

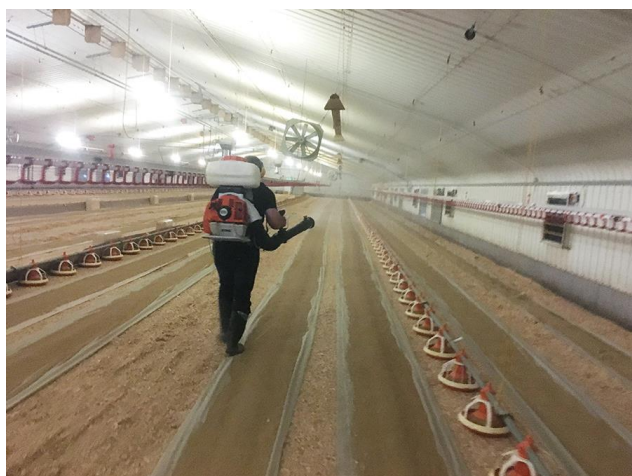
The application method (spraying) has to be carefully adapted to the selected strains, too. This is all part of the formulation which should be designed to allow optimum adhesion to various surfaces, horizontal and vertical, and ensure early growth of the bacteria (presence of specific nutrients, such as sugar). Finally, the authors indicated that the use of a positive biofilm in farm buildings can have a prolonged beneficial effect beyond building surfaces by reducing the spread of pathogenic organisms and by seeding beneficial bacteria in farm effluents, the environment and the food chain. A valuable tool within a farm-to-fork approach to biosecurity.

### **On-farm results**

Several studies have already demonstrated the benefits of positive biofilms applied to farm buildings. For example, Rodiles and others (2021) reported how an early microbial intervention on building surfaces can influence the microbial communities in a biofilm in a commercial chicken production system. The team used 16S rRNA analysis to identify the biofilm microbial populations. They detected a significant increase and persistence of two genera likely resulting from the contribution of the microbial strains contained in the product (Lalfilm Pro) that was applied. Meanwhile, important families such as Enterococcaceae and Enterobacteriaceae were limited during the first week of rearing. Further data from this study have been submitted to peer-reviewed publications.

References available on request.

## Pozytywne biofilmy podstawą ekologii mikrobiomu powierzchniowego



*W budynkach gospodarskich wszystkie powierzchnie - podłogi, ściany, sufity i wyposażenie - są kolonizowane przez biofilmy.*

**Coraz większy nacisk kładzie się na rolę i zarządzanie biofilmami mikrobiologicznymi w budynkach gospodarskich, szczególnie w kontekście ograniczenia stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych w gospodarstwie przy jednoczesnej ochronie środowiska mikrobiologicznego zwierząt. Obszerny przegląd został właśnie opublikowany w czasopiśmie **Biofilm**.**

Przegląd naukowy

Virgile Guéneau, Lallemand Animal Nutrition i INRAE

Przegląd naukowy przedstawia przewidywane sposoby działania pozytywnych biofilmów stosowanych na powierzchniach budynków inwentarskich oraz wynikające z nich kryteria wyboru odpowiednich mikroorganizmów do tego konkretnego zastosowania. Autorzy omawiają dalej zalety i wady takiego podejścia do bezpieczeństwa biologicznego, jak również jego wpływ w całym łańcuchu żywnościowym, od pola do stołu.

### **Biofilmy**

Biofilm jest definiowany jako "przestrzenie zorganizowana społeczność mikroorganizmów przytwierdzonych do powierzchni". Stanowi on najbardziej rozpowszechniony sposób życia mikroorganizmów w przyrodzie i jest wszechobecny we wszystkich środowiskach. Biofilmy wydzielają ochronną macierz zewnątrzkomórkową, która może stanowić około 85% biomasy biofilmu. W budynkach gospodarczych wszystkie powierzchnie - podłogi, ściany, sufity i wyposażenie - są kolonizowane przez biofilmy. Mogą one być nieszkodliwe, pozytywne lub negatywne dla zwierząt, jeśli zawierają patogeny. Zanim nowa partia zwierząt wejdzie do budynku, konieczne jest czyszczenie i dezynfekcja (C&D). Powierzchnie nie pozostają jednak sterylne. Mikroorganizmy przeniesione ze środowiska zwierząt oraz same nowe zwierzęta szybko zaczynają rekolonizować powierzchnie, tworząc ponownie biofilmy.

## **Uzasadnienie dla pozytywnego biofilmu**

Wśród wewnętrznych środków bezpieczeństwa biologicznego mających na celu ograniczenie utrzymywania się i proliferacji bakterii chorobotwórczych w budynkach inwentarskich, pomiędzy każdym cyklem hodowlanym stosuje się protokoły C&D z wykorzystaniem np. produktów biobójczych. Jednak kilka badań wykazało, że takie środki chemiczne mogą nie być całkowicie skuteczne w walce z biofilmami i pozwalają jedynie na eliminację części mikrobioty obecnej na powierzchniach budynków gospodarskich.

Na fermach ptaków wykazano, że protokoły C&D nie są całkowicie skuteczne w eliminowaniu pozostałych patogenów odpowiedzialnych za zanieczyszczenie krzyżowe pomiędzy różnymi partiami zwierząt, takich jak *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus* spp. i *Escherichia coli*. To zmniejszenie skuteczności C&D jest bezpośrednio związane z tworzeniem biofilmów przez te społeczności związane z powierzchnią. Chociaż przewidziano różne podejścia do zwalczania biofilmu, żadna z tych metod ochrony biologicznej nie jest uniwersalna, a największy potencjał mają strategie łączone.

Bardzo obiecującym podejściem wydaje się być kierowanie ekologią powierzchni poprzez osadzanie pozytywnych biofilmów, które będą kolonizować i fizycznie chronić powierzchnię przed namnażaniem się patogenów: strategia pozytywnego biofilmu (rysunek 1). Pozytywne biofilmy są już stosowane w wielu sektorach, takich jak spożywczy i opieki zdrowotnej, a także wykazują bardzo obiecujące wyniki w zastosowaniach w budynkach gospodarczych, gdy są stosowane jako uzupełnienie protokołów C&D.

### **Jak działają biofilmy pozytywne?**

Opisano cztery główne uzupełniające się mechanizmy wyjaśniające sposoby działania pozytywnych biofilmów na powierzchniach budynków gospodarczych (rysunek 2).

1. Efekt antyadhezyjny: obecność samego biofilmu pozytywnego lub niektórych cząsteczek przez niego wytwarzanych może ograniczać początkową adhezję patogenów na powierzchni.
- 2 & 3. Konkurencja przestrzenna i odżywcza: zajmując przestrzeń i zużywając dostępne zasoby odżywcze, pozytywny biofilm może ograniczać proliferację niepożądanych bakterii.
4. Ingerencja drobnoustrojów: poprzez wydzielanie specyficznych efektorów, takich jak kwasy organiczne lub cząsteczki antagonistyczne, biofilmy pozytywne mogą tworzyć niekorzystne środowisko, które pomaga złagodzić obecność niepożądanych mikroorganizmów na powierzchni.

### **Wybór najlepszego kandydata**

Zaawansowane techniki przesiewowe i metagenomiczne są wykorzystywane do wyboru najlepszych szczepów bakterii zdolnych do tworzenia pozytywnych biofilmów na powierzchniach budynków gospodarczych i pomagających utrzymać patogeny na dystans. Nawet jeśli selekcja rozpoczyna się w laboratorium, naukowcy zapewniają, że wybrane bakterie są dostosowane do warunków ekobiologicznych i fizykochemicznych panujących w gospodarstwie. Większość produktów dostępnych na rynku to mieszanki bakterii kwasu mlekowego (LAB) i gatunków *Bacillus*. Wykazano synergii pomiędzy tymi gatunkami. Zaobserwowano na przykład, że biofilm tworzony przez *Bacillus subtilis* chroni LAB przed wysychaniem.

Również sposób aplikacji (oprysk) musi być starannie dostosowany do wybranych szczepów. To wszystko jest częścią preparatu, który powinien być tak opracowany, aby umożliwić optymalne przyleganie do różnych powierzchni, poziomych i pionowych, oraz zapewnić wczesny wzrost bakterii (obecność określonych składników odżywczych, np. cukru). Wreszcie, autorzy wskazali, że zastosowanie pozytywnego biofilmu w budynkach gospodarskich może mieć długotrwały korzystny wpływ poza powierzchniami budynków poprzez ograniczenie rozprzestrzeniania się organizmów patogennych i poprzez zasiew korzystnych bakterii w ściekach z gospodarstwa, środowisku i łańcuchu żywnościowym. Jest to cenne narzędzie w ramach podejścia do bezpieczeństwa biologicznego w gospodarstwie.

### **Wyniki w gospodarstwach rolnych**

W kilku badaniach wykazano już korzyści z pozytywnych biofilmów zastosowanych w budynkach gospodarskich. Na przykład Rodiles i inni (2021) donieśli o tym, jak wczesna interwencja mikrobiologiczna na powierzchniach budynków może wpłynąć na społeczności mikrobiologiczne w biofilmie w komercyjnym systemie produkcji kurcząt. Zespół wykorzystał analizę 16S rRNA do identyfikacji populacji mikrobów w biofilmie. Wykryto znaczny wzrost i utrzymywanie się dwóch rodzajów, co prawdopodobnie wynika z udziału szczepów bakterii zawartych w produkcie (Lalfilm Pro), który został zastosowany. Tymczasem ważne rodziny takie jak Enterococcaceae i Enterobacteriaceae były ograniczone w pierwszym tygodniu hodowli. Dalsze dane z tego badania zostały złożone do publikacji recenzowanych.

Piśmiennictwo dostępne na życzenie.