

## PROCEDURE DE PRELEVEMENT MICROBIOLOGIQUE DES PAROIS DE GERLES EN BOIS EN AOP SALERS.

### OBJECTIFS DE LA METHODE :

Evaluer l'efficacité des méthodes d'entretien et de nettoyage des gerles en bois utilisées en AOP Salers en réalisant des prélèvements sur la surface des gerles en bois permettant de récupérer un maximum de flores. Cette méthode est non destructive et peut être utilisée en routine par les techniciens.

### 1) MATERIEL NECESSAIRE :

- Pot (ou flacon) stérile, contenant 100 ml de solution de récupération composée : de peptone (1g/l), de sel (8,5g/l) et de tween 80 (5ml/l).
- Flacon + gaze stérile
- Brosse à dent (marque Signal®, dureté médium) stérile, contenue dans un sachet stérile.
- Gants, alcool, pince, pochoir en plastique\*, double décimètre en plastique, scotch.

\*Pochoir : cadre en plastique semi-rigide de 1 cm de largeur dont la surface évidée centrale correspond aux dimensions des surfaces à prélever.



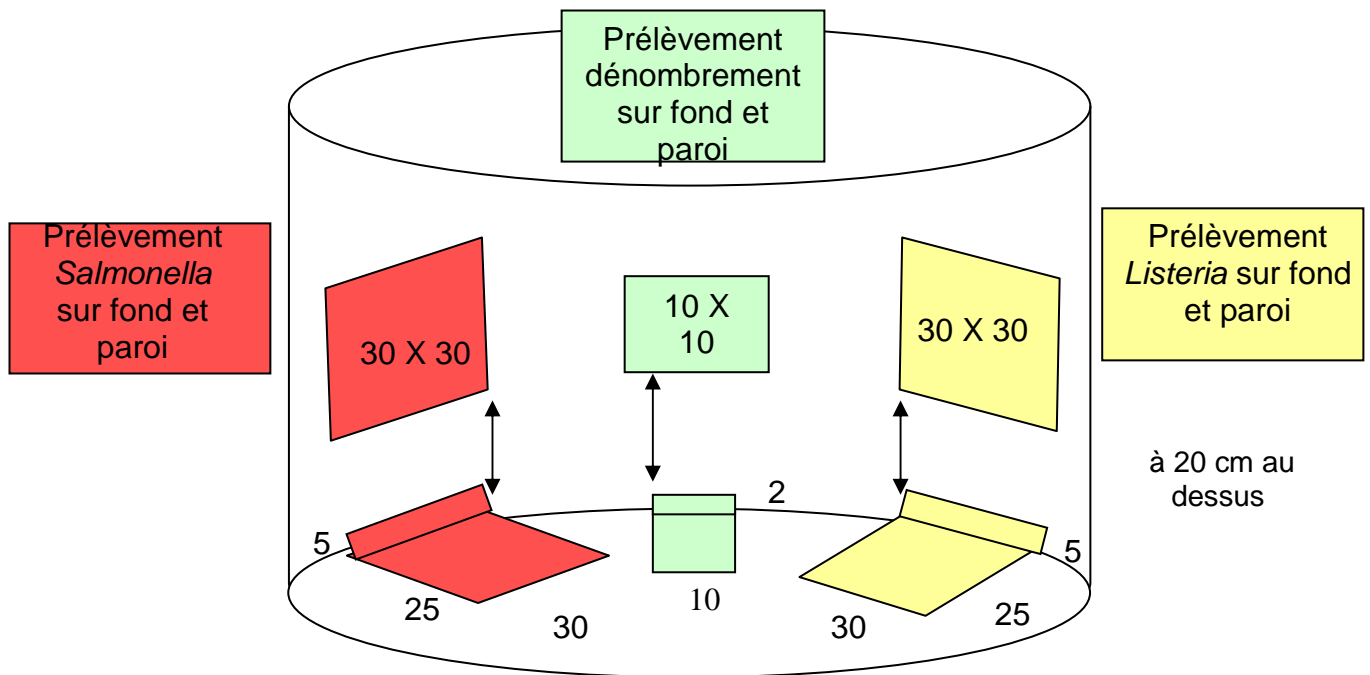
### 2) MISE EN ŒUVRE :

Cette méthode consiste dans un premier temps à un brossage de la zone de prélèvement, puis à un écouvillonnage sur la zone ainsi brossée, afin de récupérer un maximum de germes. Les prélèvements se réalisent sur la paroi et le fond de la gerle. Il est conseillé d'éviter d'inclure dans la zone prélevée un nœud du bois car sa densité et sa composition spécifique constitue une zone non représentative de la surface de la gerle.

1. Mettre des gants stériles
2. Désinfecter le pochoir à l'alcool, puis délimiter les différentes zones de prélèvement par l'apposition du pochoir sur le bois et en le maintenant si nécessaire par du scotch.  
(Remarque : le double décimètre permet de placer le pochoir plus aisément à partir de repères d'un prélèvement à l'autre pour une même gerle.) **cf. photos ci-dessous.**
3. Au niveau du fond inclure un angle dans le prélèvement. Pour cela, délimiter 5 cm au niveau de la paroi et 25 cm sur le fond pour les recherches de *Listeria* et *Salmonella* (prélèvement sur une surface de 900 cm<sup>2</sup>) et 2 cm sur la paroi et 8 cm sur le fond pour les dénombrements de flores (prélèvement sur une surface de 100 cm<sup>2</sup>). **cf. figure page suivante.**



La surface à prélever est délimitée par l'apposition du pochoir



4. Ouvrir le flacon de prélèvement contenant la solution.
5. Sortir la gaze et la poser dans le couvercle du flacon (avec la brosse à dent ou la pince stérilisée par flambage).
6. Tremper la brosse à dent dans la solution. Si la gerle est déjà humide, il n'est pas nécessaire de l'humidifier davantage. Si par contre elle est sèche, il faut humidifier la brosse et le bois plusieurs fois si nécessaire en la trempant dans la solution de récupération.
7. Gratter, à l'aide de la brosse à dent, trois aller-retour dans le sens des fibres du bois puis et trois aller-retour dans le sens opposé des fibres (à la perpendiculaire des fibres), sur l'ensemble de la zone à contrôler.
8. Rincer la brosse à dent dans la solution du flacon pendant quelques secondes en agitant la brosse. Les micro-organismes n'adhèrent pas aux brosses à dents plastiques dans les conditions de rinçage testées.
9. Sortir la gaze avec la brosse à dent ou la pince stérilisée par flambage.
10. Frotter à l'aide de la gaze la surface précédemment grattée avec la brosse. Tenir la gaze avec une pince stérilisée à l'alcool et/ou avec la main munie d'un gant stérilisé à l'alcool.
11. Récupérer la gaze dans le flacon contenant la solution dans laquelle a été rincée la brosse à dents.
12. Etiqueter le flacon en apposant le numéro d'identification sur le bouchon.



### 3) PROTOCOLE DE NETTOYAGE ET DE DESINFECTION DES BROSSES A DENT :

Les brosses a dents peuvent être ré-utilisées, à condition de respecter un protocole de nettoyage-désinfection rigoureux :

- ✓ Rincer une première fois les brosses à dent sous l'eau.
- ✓ Les faire tremper dans une solution de nettoyage-désinfection (Bactérianos, Surfanios) pendant 2 à 4 heures minimum.
- ✓ Bien rincer les brosses à dent sous l'eau claire plusieurs fois.
- ✓ Faire sécher les brosses à dent dans une étuve (1 nuit).
- ✓ Les placer dans un container de stérilisation (par exemple, containers cylindriques en polypropylène de 3,5cm de diamètre et 21 cm de longueur, équipé d'un couvercle). Mettre 1 à 2 brosses par container et stériliser à l'autoclave à 105°C pendant 30 minutes.

Les brosses à dents ne doivent pas être stérilisées à plus de 105°C car cela peut modifier la souplesse des poils.

Normalement, les brosses peuvent être stérilisées au moins 5 fois sans que l'on constate d'altération de couleur ou de forme. Dans tous les cas elles seront à changer dès qu'elles présenteront un aspect différent de celui des brosses neuves (léger brunissement de la couleur des poils).

- ✓ Ou bien les déposer sur un plateau stérile, sous UV dans une hotte de sécurité microbiologique pendant au minimum une heure. Les placer par 2, dans un sachet stérile de prélèvement (sachet SPR) et fermer hermétiquement. Conserver les sachets en chambre froide à 2°C +/- 2°C jusqu'à utilisation.

Des tests de stérilité des brosses à dent ont été réalisés : tous les résultats en flore totale, coliformes à 30°C et *Pseudomonas* ont donné des résultats < 1 UFC/ml de suspension analysée.

#### 4) COMMENTAIRES DES AUTEURS :

Cette technique de prélèvement a été évaluée dans nos travaux par rapport à la méthode « Rankine Pilone » (méthode destructrice de référence au Centre Technique du Bois et de l'Ameublement, basé sur l'application d'ultra-sons et de cycles de vide). Le CTBA a conclu à l'équivalence des 2 méthodes en termes de quantités récupérées de flores. La comparaison entre les 2 méthodes a porté sur les microorganismes suivants : *Lb. plantarum*, *Ln. mesenteroides* et *K. lactis* pour les flores utiles ; *P. fluorescens* pour les Gram - ; *S. aureus* et *L. monocytogenes* pour les pathogènes.

Les prélèvements ont été analysés le jour même ou le lendemain pour les prélèvements effectués le soir.

#### Autres commentaires sur la méthode décrite dans cette fiche :

- Respecter le protocole de nettoyage et désinfection des brosses à dent.
- Conserver les flacons avant et après prélèvements au froid (0°C à 4°C). Après prélèvement les flacons peuvent se garder entre 24 et 72 heures au froid, si des analyses complémentaires sont nécessaires.
- Bien agiter les flacons et leur gaze juste avant de réaliser les analyses.

#### Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre cette méthode :

Mise au point de méthodes d'entretien et de décontamination des gerles en bois pour la fabrication de fromages AOP Salers. Ces travaux ont été menés dans le cadre du Pôle Fromager AOC Massif Central.

<p><b>Auteurs :</b>  <b>DEFARGUES Catherine</b>, LIAL MC, 38 rue de salers Aurillac,  <b>DIDIENNE Robert</b>, INRA, 20 côte de Reyne, Aurillac.          Méthode mise en œuvre sous la responsabilité du LIAL MC à Aurillac</p>	<p><b>Créé le :</b>          Sept 2010.</p>	<p><b>Modifiée le :</b></p>
---	---	-----------------------------

Pour en savoir plus :

Catherine DEFARGUES (LIAL-MC)  
 Robert DIDIENNE (INRA).

### RMT filières fromagères valorisant leur terroir

Appelé "Réseau fromages de terroirs", il a pour vocation de répondre aux sollicitations de filières organisées valorisant les ressources de leurs terroirs (AOP, IGP, fermiers...). Ce RMT regroupe une dizaine de partenaires professionnels, technique, de la recherche et de la formation.

Ces actions concernent les caractéristiques des fromages, la durabilité des filières, la diversité sensorielle et le marché.

Des ouvrages et fiches de synthèse, des outils ou encore des journées de formation/information seront proposées aux filières valorisant leurs terroirs.

Le RMT est co animé par le CNAOL et le Suaci Alpes Page 16

Contacts :  
[nballot@cniel.com](mailto:nballot@cniel.com)  
[ahauwuy@suacigis.com](mailto:ahauwuy@suacigis.com)

