PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

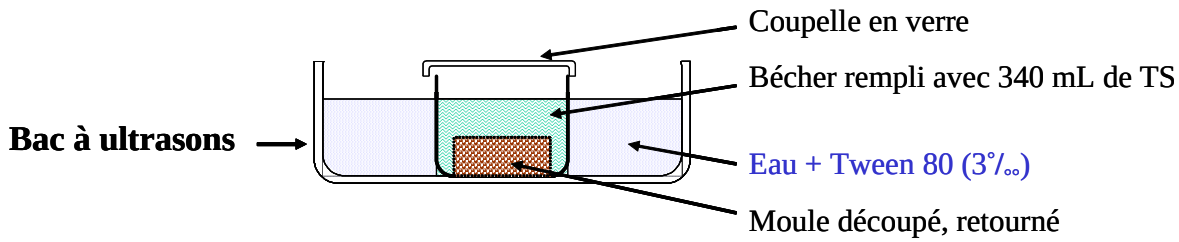
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

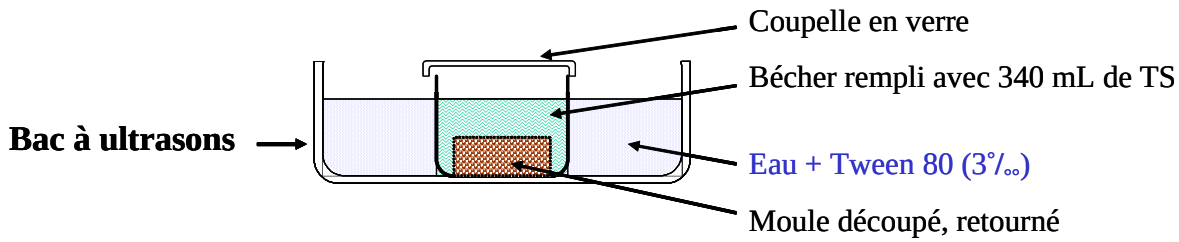
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

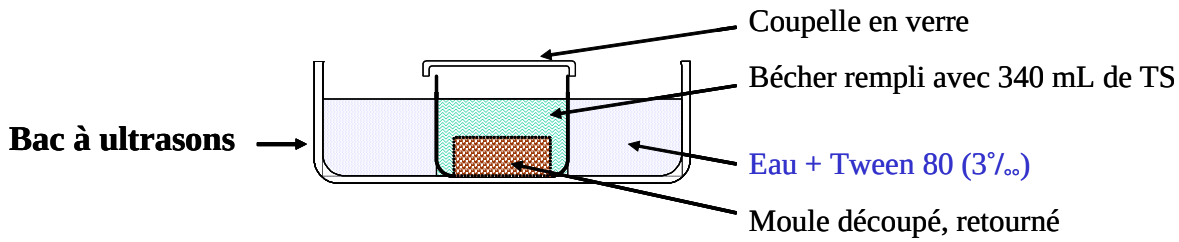
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

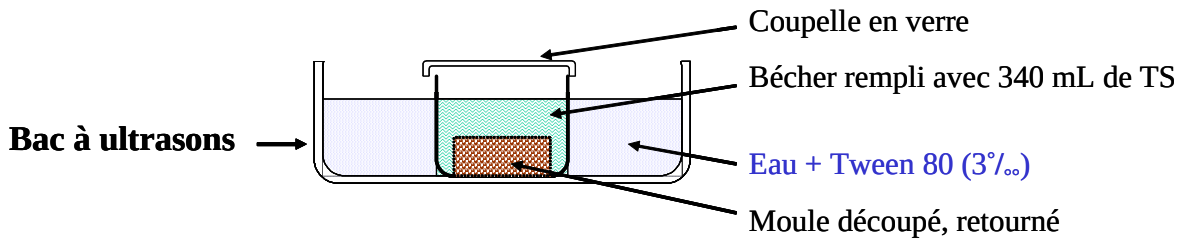
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

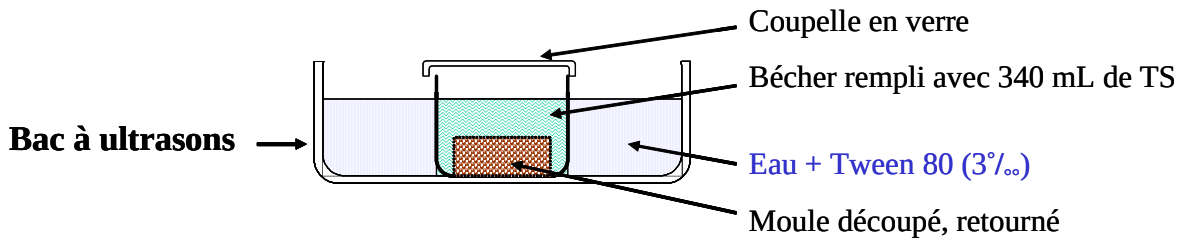
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

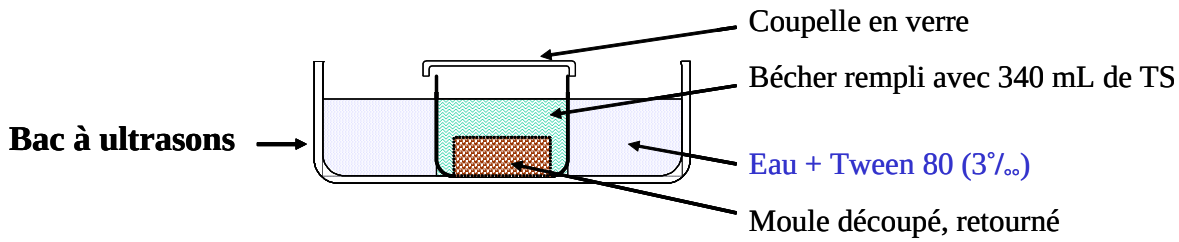
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

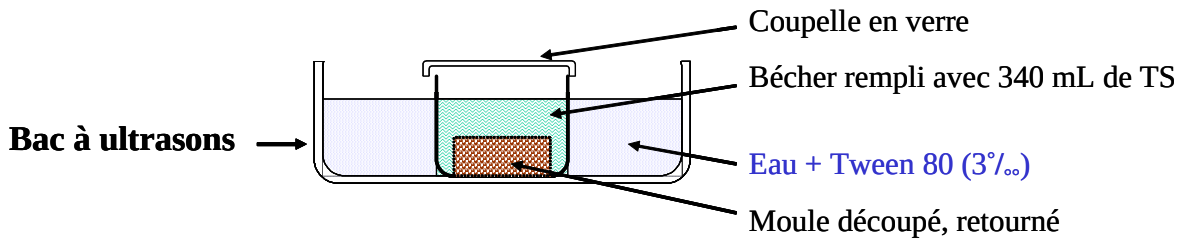
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

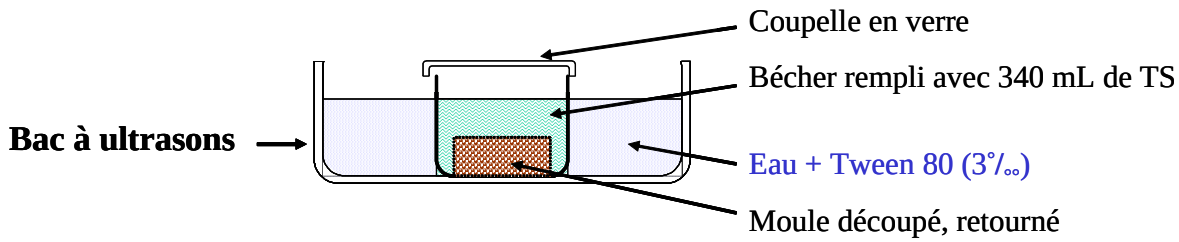
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

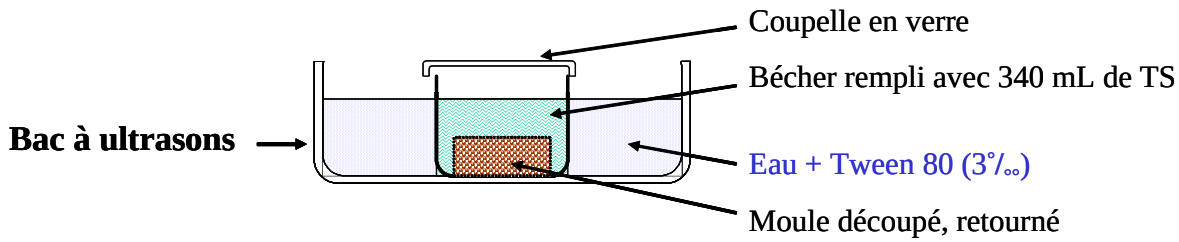
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

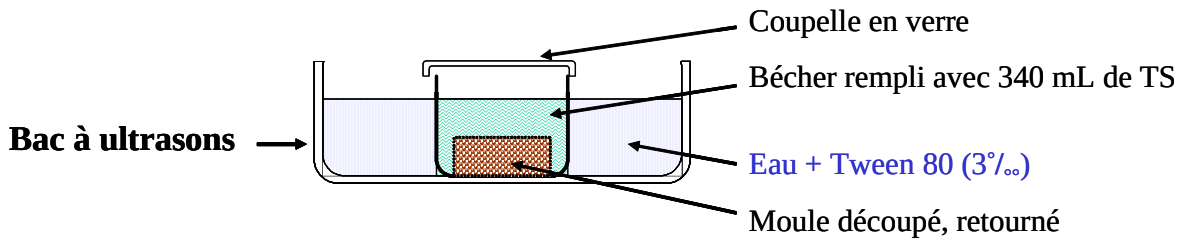
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

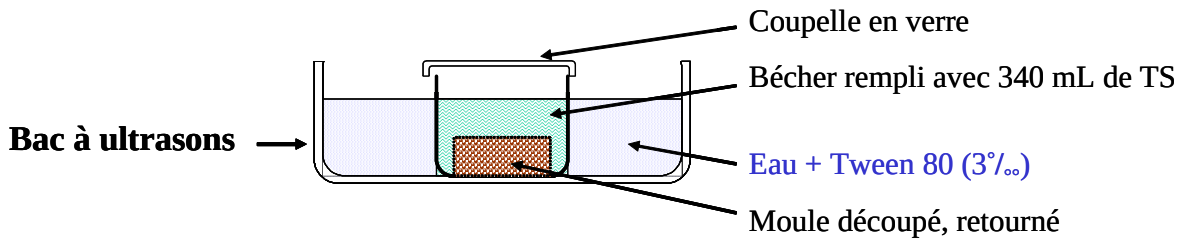
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

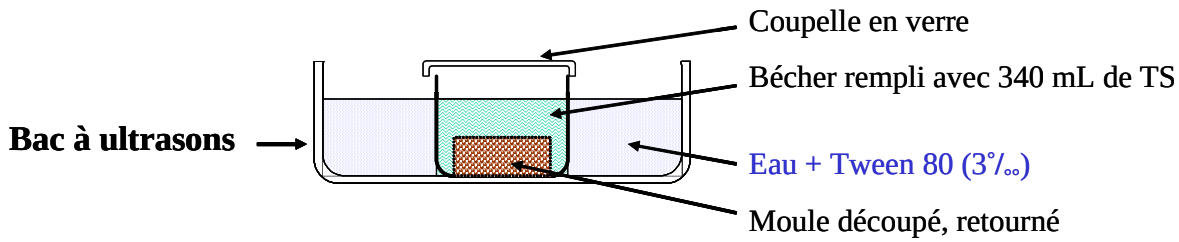
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

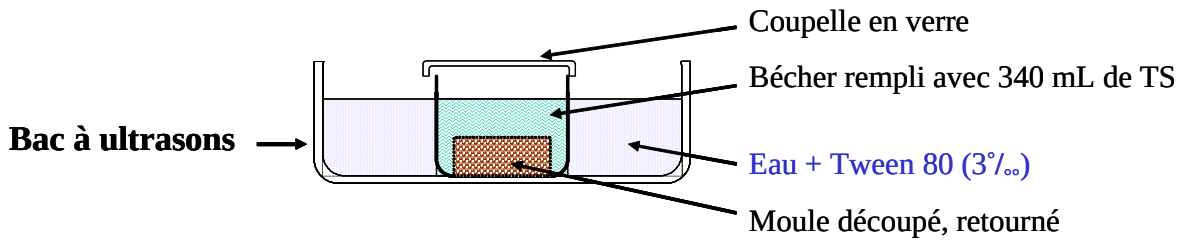
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

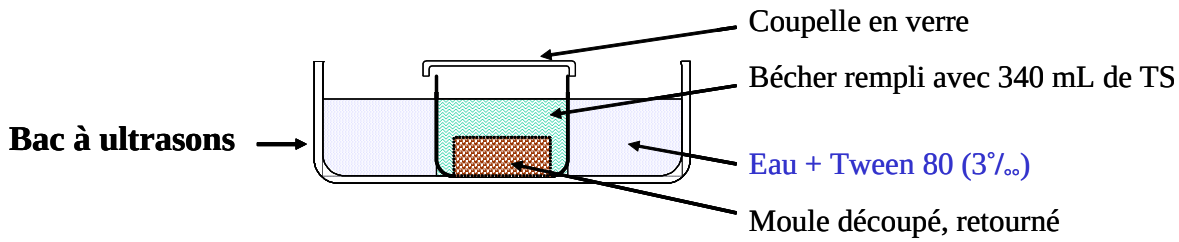
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

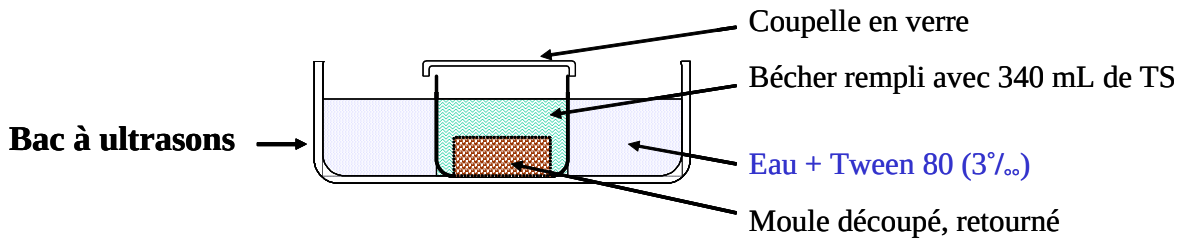
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

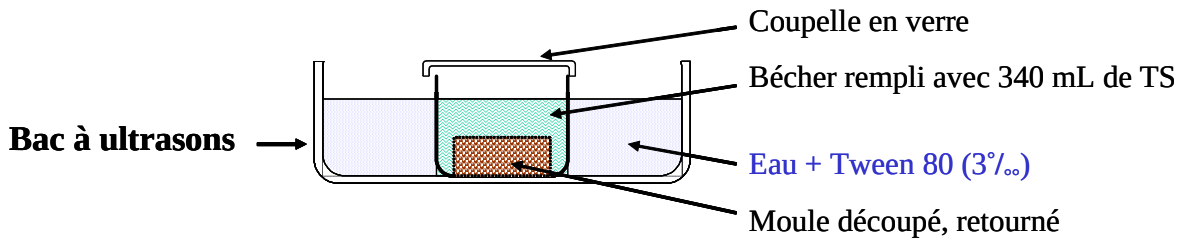
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

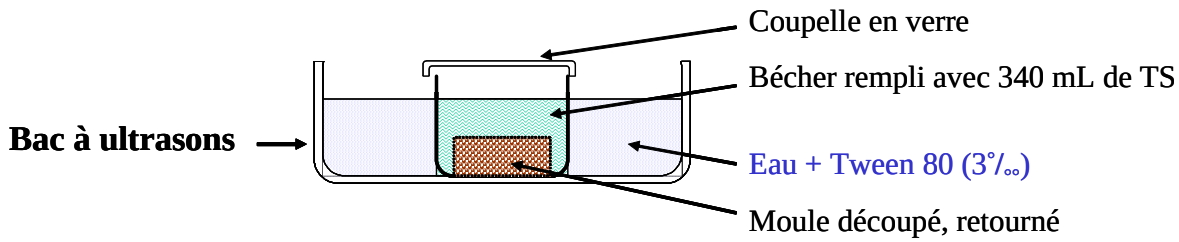
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

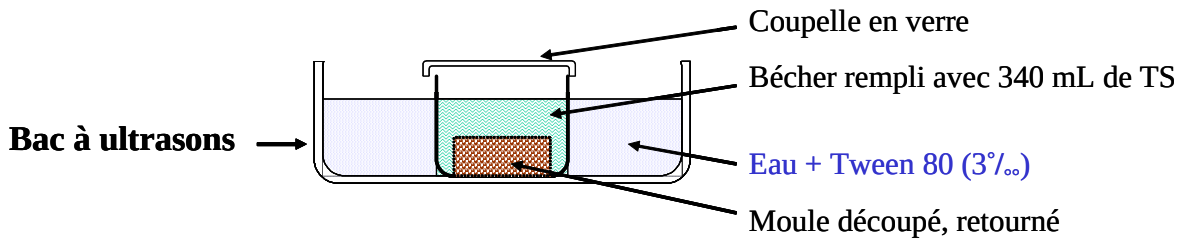
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

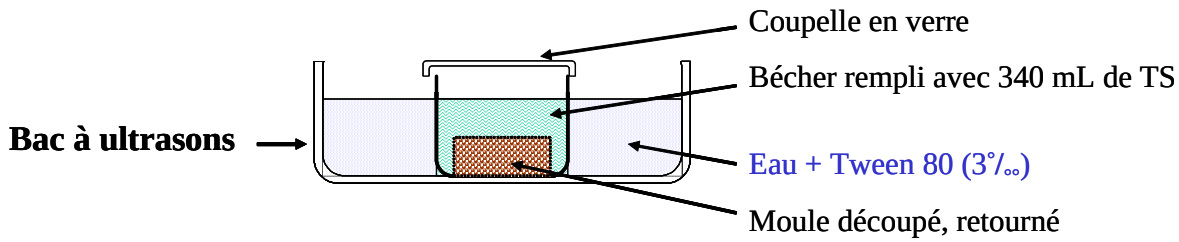
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

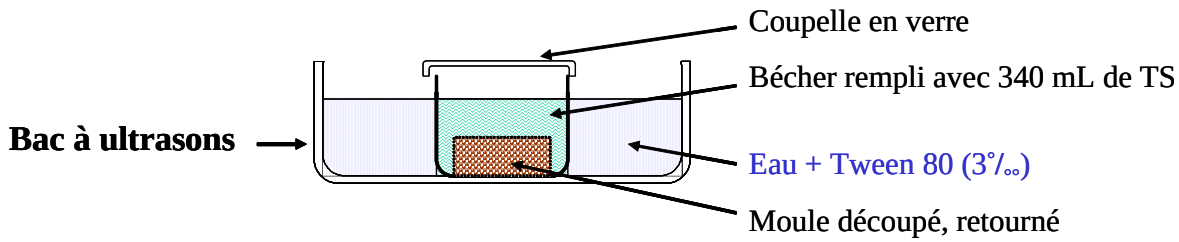
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

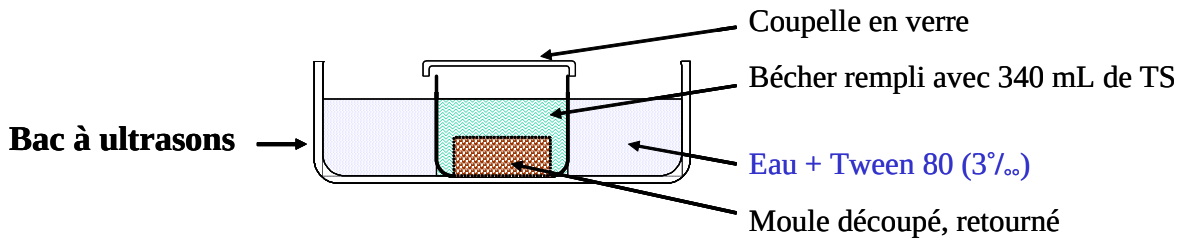
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

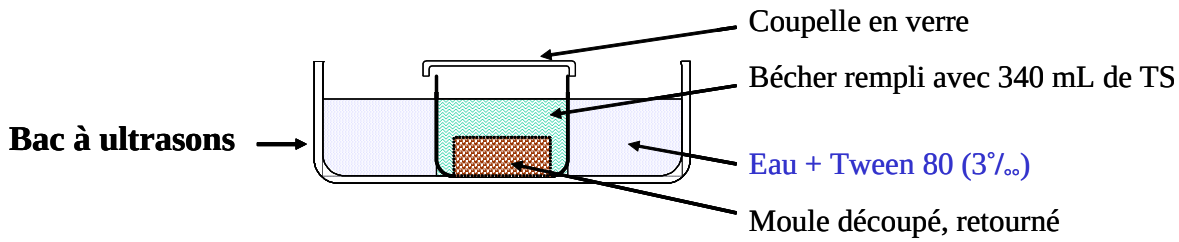
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

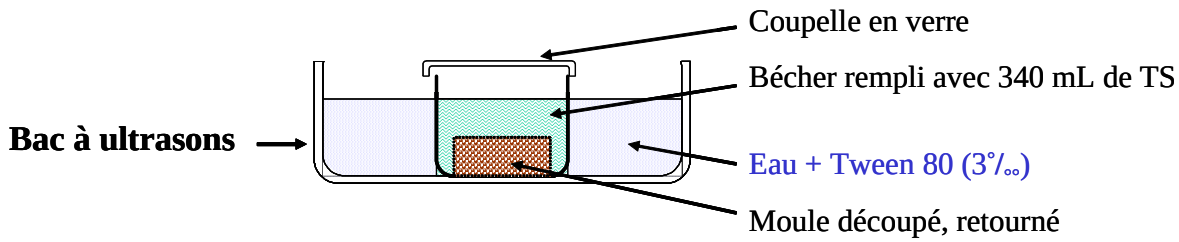
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

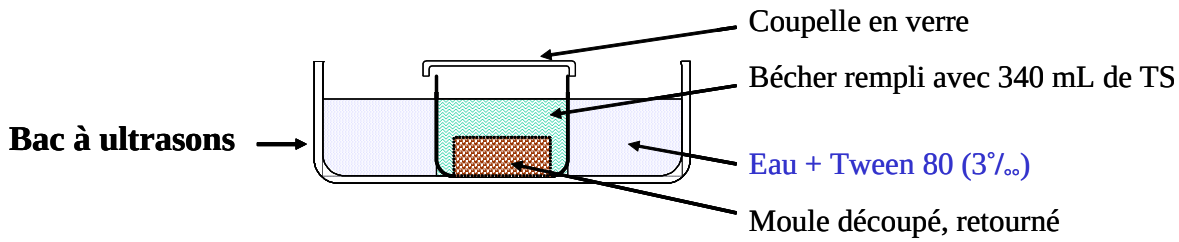
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

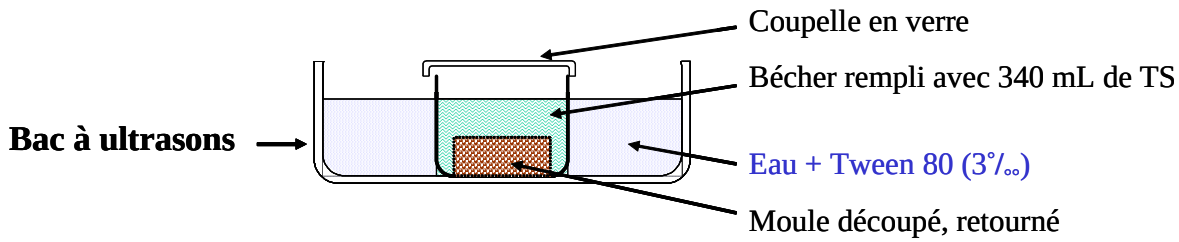
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

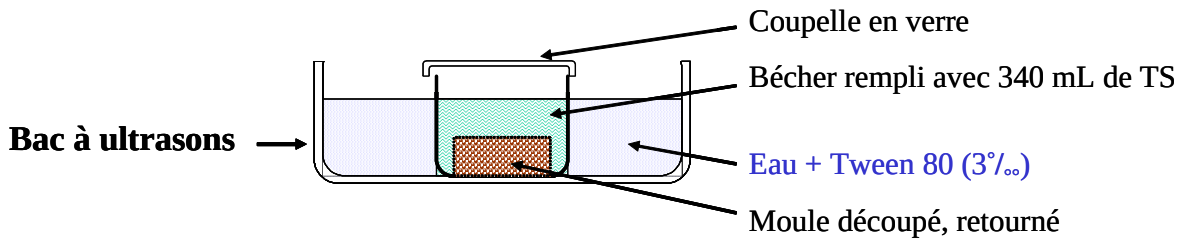
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

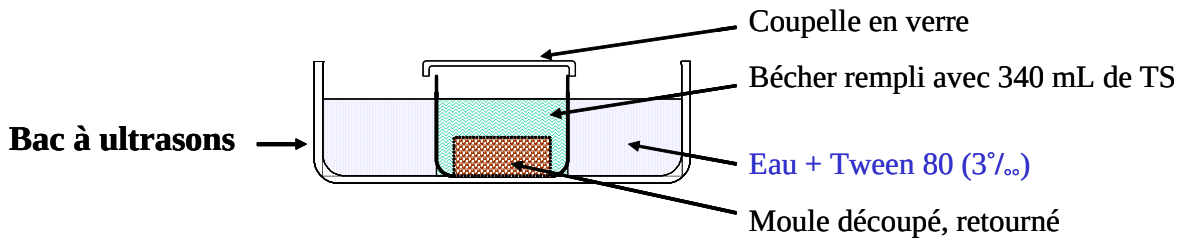
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

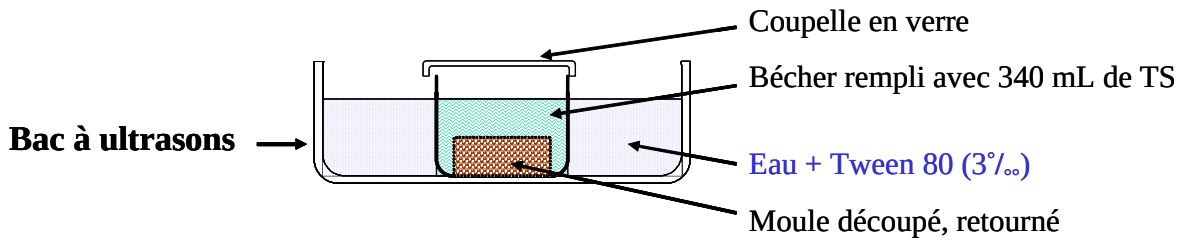
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

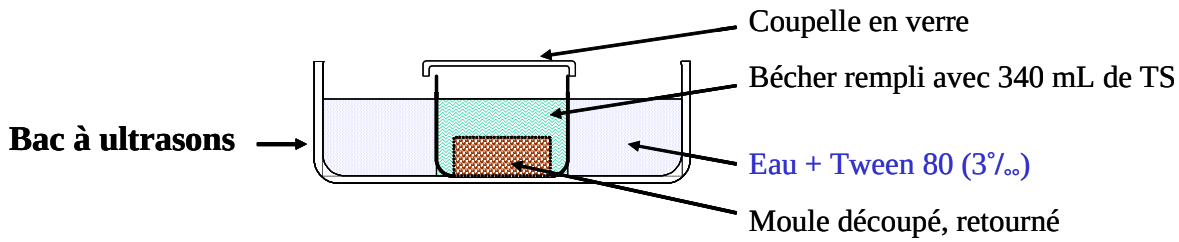
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

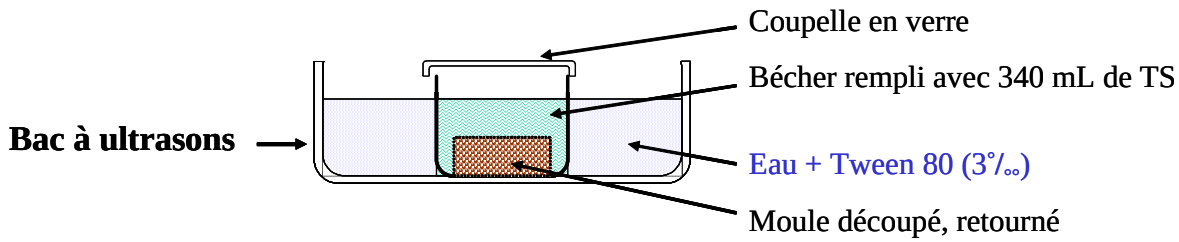
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

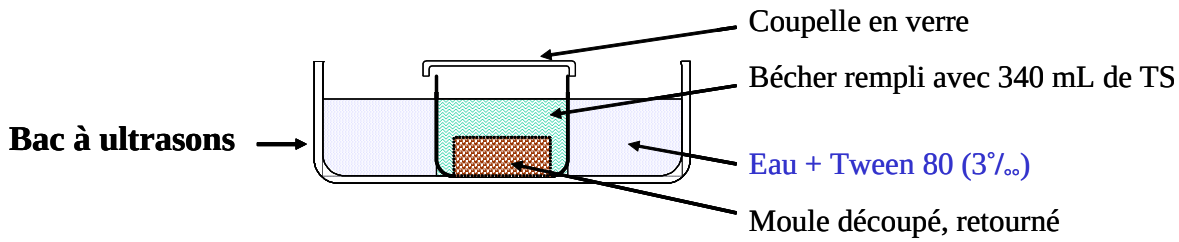
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

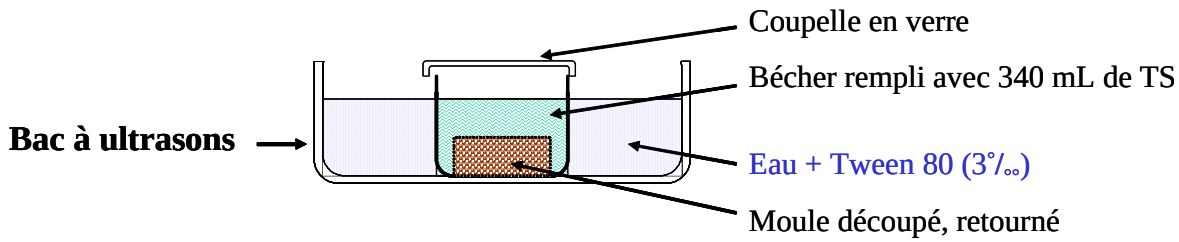
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

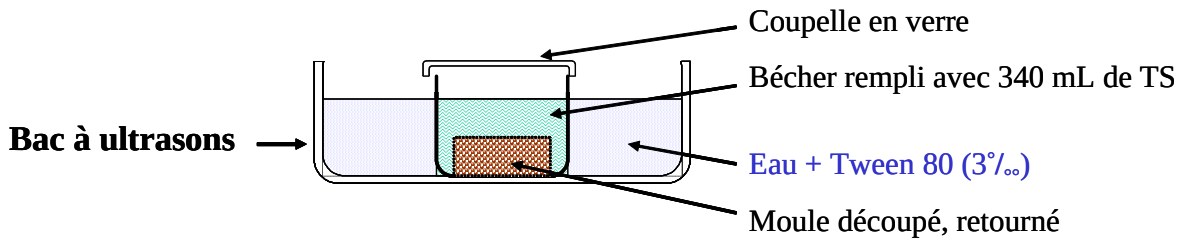
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

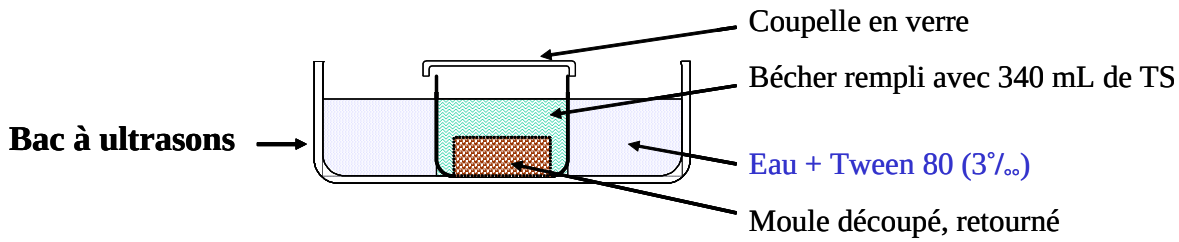
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

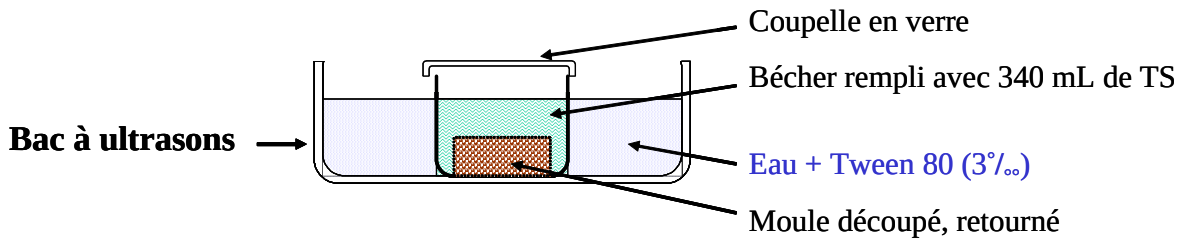
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

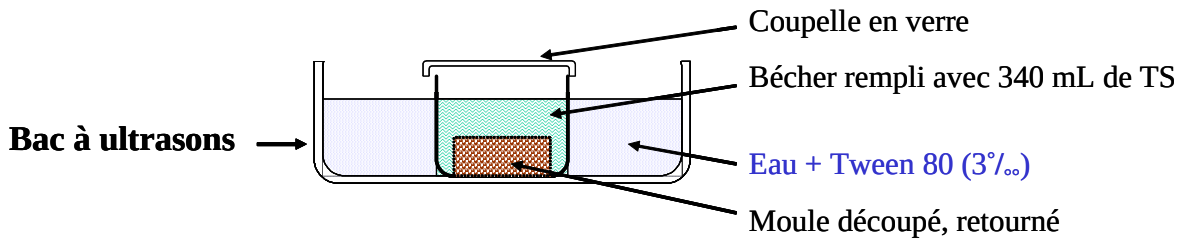
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

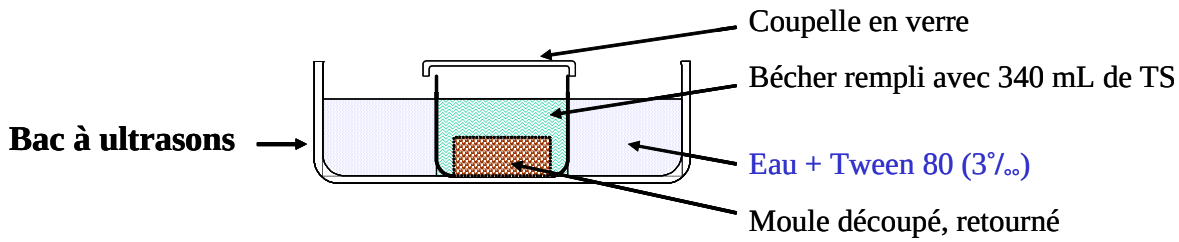
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

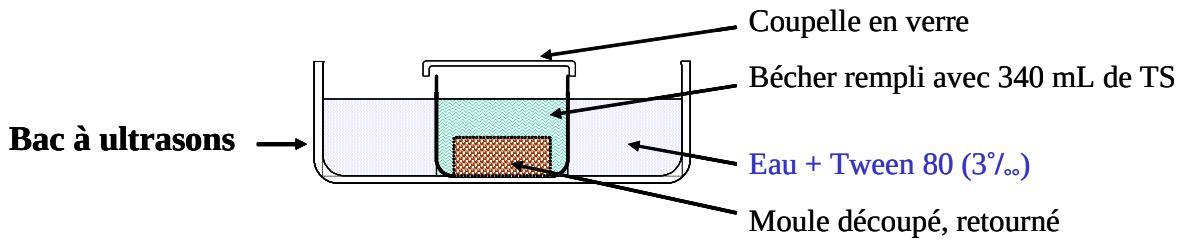
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

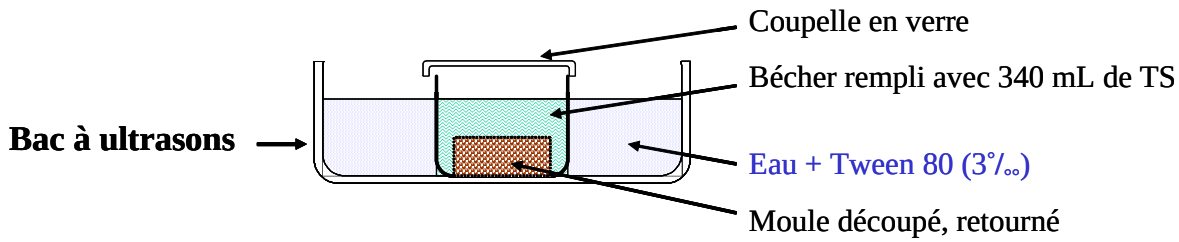
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

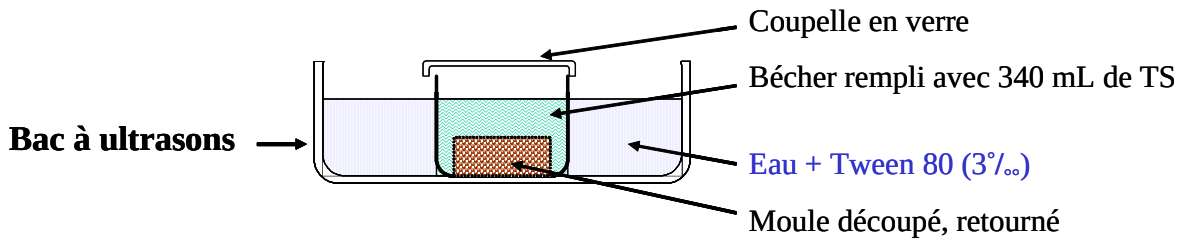
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

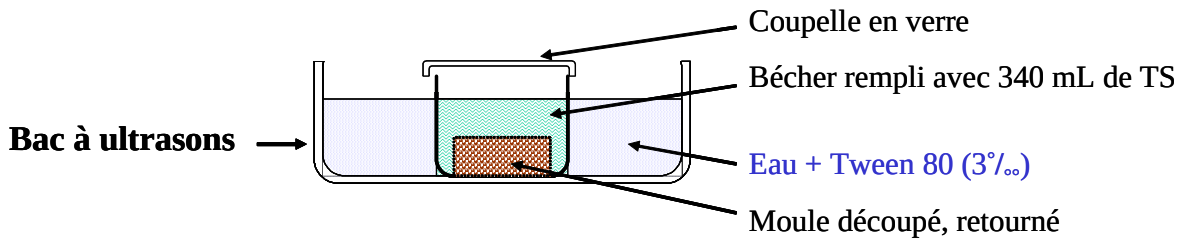
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

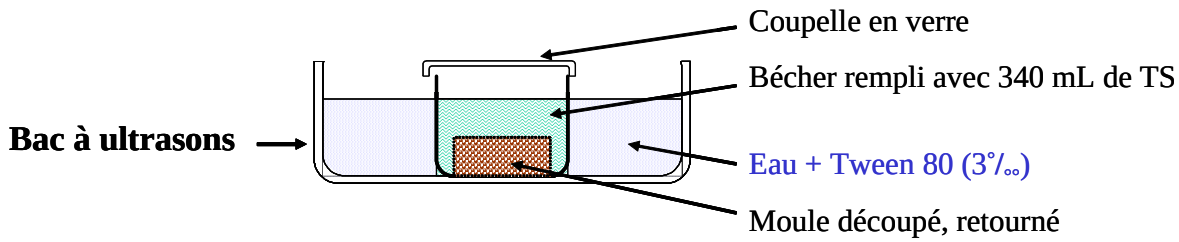
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

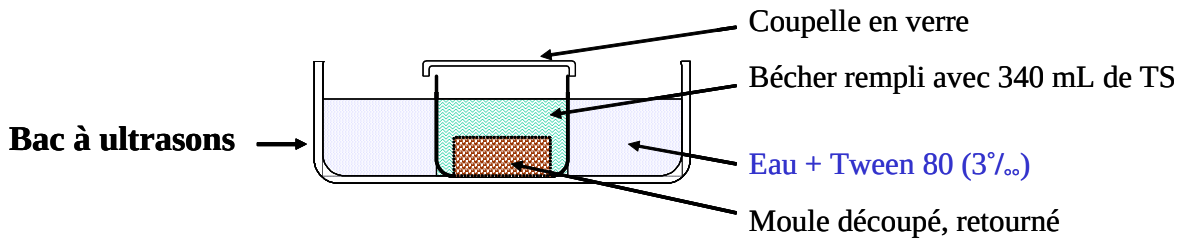
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

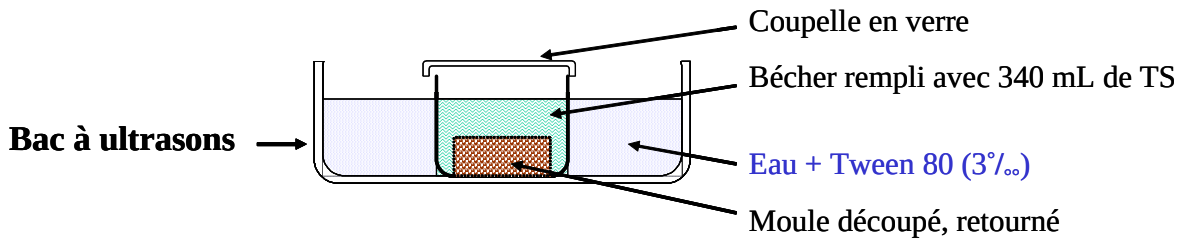
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

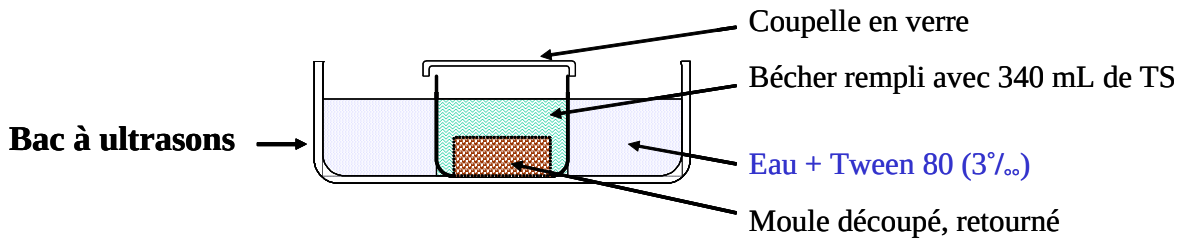
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

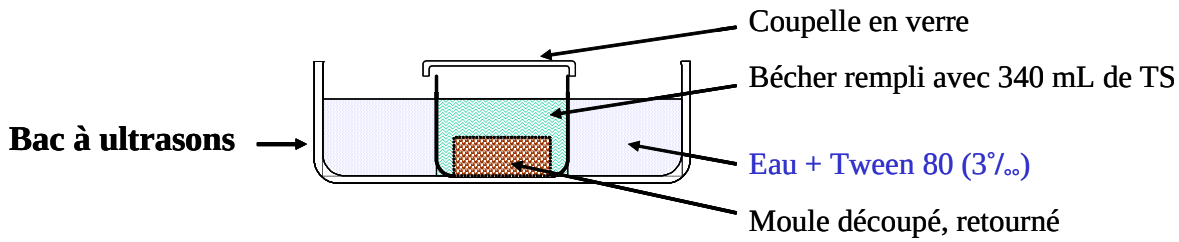
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

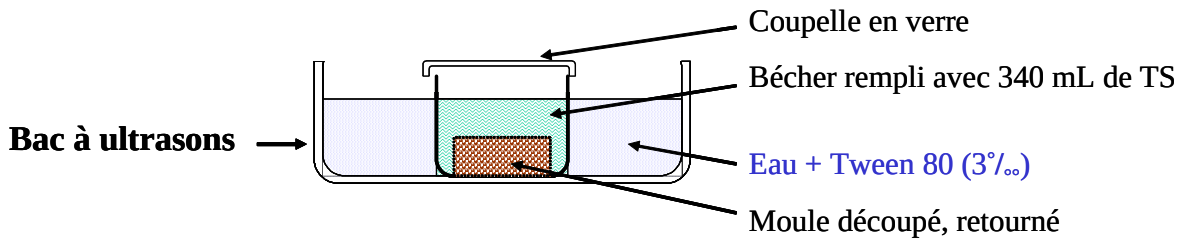
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

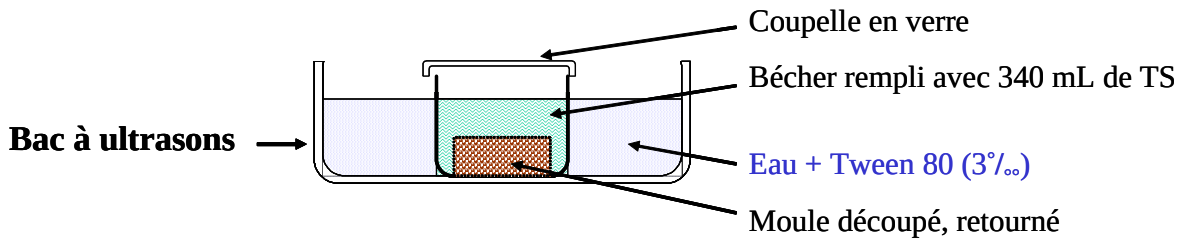
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

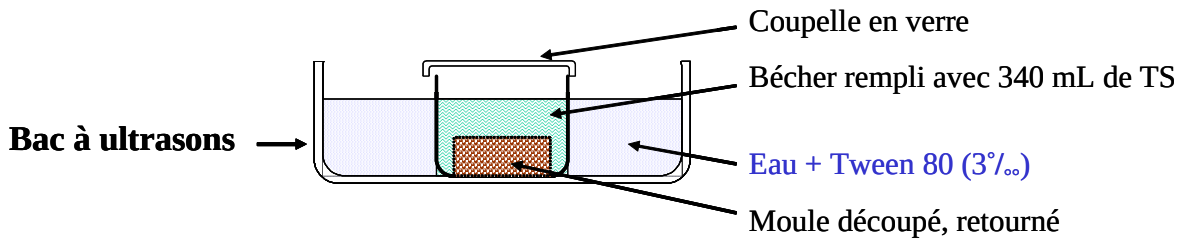
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.

PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

UTILISATION DES CHIFFONETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.
Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 × 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

- POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.
Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.
Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemencer les différents milieux de culture.

- POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, …ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).
-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

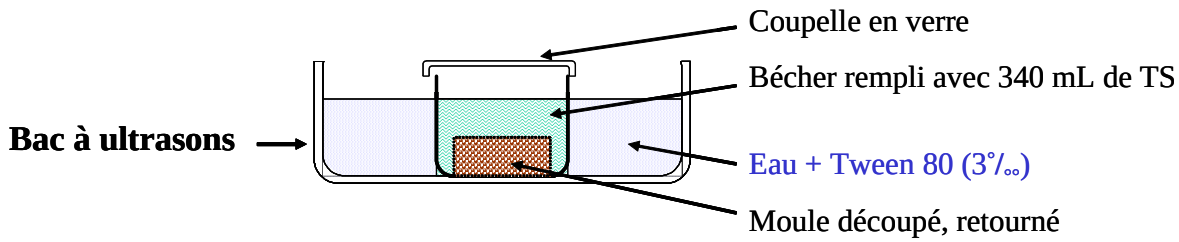
UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3%° de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensui te installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm² de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effet préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇨ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage…)
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

Auteurs	Date de mise à jour :	
BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage **Ont participé à cette fiche :** - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnés Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	Décembre 2009	

Pour en savoir plus :
Julie Barral (Actilait) : j.barral@actilait.com
Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

Contacts :
nballot@cniel.com
ahauwuy@suacigis.com

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale "Développement agricole et rural"

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 du Nord.