

PRÉLEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES DES PLANCHES D’AFFINAGE EN BOIS

1) OBJECTIF DE LA MÉTHODE :

Une surface recouverte d'un diluant visqueux semi-solide est frottée à l'aide d'une brosse à dent. Ce procédé permet de décrocher par une action mécanique, les bactéries fixées sur la surface des planches et de les récupérer avec une solution de captage. Une récupération des bactéries, complémentaire au brossage est réalisée au moyen de carrés de chiffonnettes.

2) LE PRINCIPE :

Une surface recouverte d'un diluant visqueux semi-solide est frottée à l'aide d'une brosse à dent (type standard à poil dur et manche droit). Ce procédé permet de décrocher par une action mécanique, les bactéries fixées sur la surface des planches et de les récupérer avec une solution de captage. Une récupération des bactéries, complémentaire au brossage est réalisée au moyen de carrés de chiffonnettes.

3) INTRODUCTION

L'état de surface particulier du bois rend difficile la récupération des microorganismes, ce qui explique en partie l'origine des résultats contradictoires dans les diverses études scientifiques publiées. Il existe des méthodes de prélèvements destructives et non destructives.

Les méthodes non destructives couplant prélèvement et dénombrement microbien (telles que boîte contact, pétrifilm, ...) ne sont pas évoquées dans cette fiche car elles sous-estiment le niveau de population microbienne puisqu'elles ne décrochent qu'une partie des microorganismes.

Comparée à la méthode par ultrasons mettant en jeu une sonotrode, la méthode non destructive par brossage décrite dans cette fiche paraît suffisamment efficace pour décrocher le biofilm microbien et permettre ainsi d'évaluer l'écosystème microbien.

Elle est cependant moins robuste car moins reproductible : la pression et la vitesse de brossage faisant varier le taux de récupération de la microflore (effet opérateur).

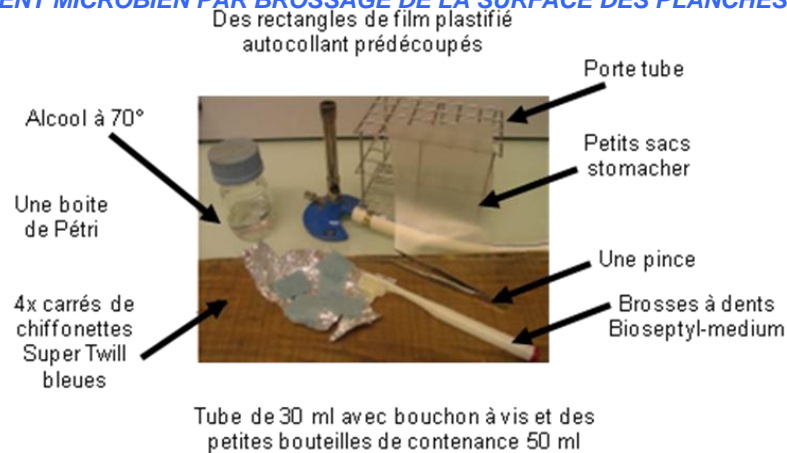
Cependant, c'est une méthode de contrôle, simple, peu onéreuse et facile à mettre en œuvre.



Copyright : CTFC

PROTOCOLE DE PRÉLÈVEMENT MICROBIEN PAR BROSSAGE DE LA SURFACE DES PLANCHES

1/ MATÉRIEL DE BASE :



2/ PRÉPARATION AU LABORATOIRE :

- DÉSINFECTION DES BROSSES À DENT :** tremper les brosses à dents (type standard à poil dur et manche droit) dans une solution bactéricide de type IDOS DN (Eurochimic) à 0,5 % pendant 5 min puis les rincer et les sécher à l'étuve. Les autoclaver ensuite à 110°C pendant 15 min, emballées individuellement dans du papier aluminium. En fromagerie, utiliser un lave-vaisselle ou un trempage avec un produit désinfectant ménager (javel), et/ou un bain d'eau chaude pour ébouillanter les brosses à dent.
- STÉRILISATION DES CHIFFONNETTES (SI ACHETÉES NON STÉRILES) :** autoclaver des carrés de chiffonnettes d'environ 3 cm x 3 cm, à 121°C pendant 15 min, à raison d'une dizaine de chiffonnettes enveloppées dans du papier d'aluminium.
- PRÉPARATION DU MATÉRIEL :**
 - un tube de 15 ml de Ringer (Biokar), additionné de Tween 80 (MERCK- surfactant permettant de faciliter le décollement des micro-organismes) à 2 g/l et d'agar (gélose) à 3 g/l.
 - petites bouteilles avec 30 ml de Ringer.
 - une boîte de Pétri contenant du Ringer.

3/ PROTOCOLE SUR SITE :

- SUR LA PLANCHE, DÉLIMITER UNE ZONE** de 25 cm² (4 x 6,25 cm) ou de 10 cm² (4 x 2,5 cm), vers les surfaces de marquage des fromages (zone de contact) en évitant les éventuelles hétérogénéités de surface (nœud, fente), avec les rectangles de film plastifié propres et stériles (nettoyés au préalable à l'alcool à 70° et placés dans un sachet stérile).
- DÉSINFECTION DU FILM PLASTIFIÉ** en frottant les zones plastifiées à l'aide d'un écouvillon trempé dans de l'alcool à 70
- SUR LA ZONE DÉLIMITÉE**, déposer 1 ml de Ringer contenant le Tween 80 et l'agar.
- BROSSER IMMÉDIATEMENT** la surface avant que le Ringer ne pénètre dans le bois, avec une brosse à dent : effectuer 10 passages horizontaux et 10 passages verticaux sur la totalité de la surface à examiner en évitant de faire des projections.



e) RÉCUPÉRATION DES BACTÉRIES :

- Verser dans un sac Stomacher®, le contenu d'une petite bouteille soit 30 ml de Ringer, sans Tween 80, ni agar.
- Placer la brosse à dent dans le sac et rincer les poils de la brosse à dent dans le Ringer, en les frottant avec les doigts à travers le sac Stomacher®, durant un temps permettant de visualiser l'absence de Ringer entre les poils (environ 1 minute)
- Sortir la brosse à dent du sac.
- Tamponner la zone délimitée à l'aide de 3 carrés de chiffonnettes stériles et sèches, tenus avec une pince (flambée au préalable à l'alcool à 70°) et les mettre dans le sac Stomacher®.
- Tamponner une dernière fois la surface avec un quatrième carré de chiffonnette stérile et humidifiée à l'aide du Ringer contenu dans la boîte de Pétri et le placer également dans le sac Stomacher®.

4/ PROTOCOLE DE TRAITEMENT DES PRÉLÈVEMENTS EN LABORATOIRE :

MALAXER LE SAC AU STOMACHER® pendant 2 min à force maximum afin d'obtenir une suspension homogène.

Indépendamment de la méthode de prélèvement, d'autres éléments sont à prendre en compte pour le contrôle :

- ◆ stade de prélèvement :
 - avant nettoyage, le contrôle permettra d'estimer la charge microbienne
 - après nettoyage, il s'agira d'un contrôle d'efficacité de celui-ci
- ◆ fréquence de prélèvement :
 - à ajuster en fonction du risque (type de fromages, pratiques, ...)
- ◆ zone de prélèvement :
 - à raisonner en fonction du risque (cf. commentaires des auteurs)

Commentaires des auteurs :

Comparaison avec d'autres méthodes possibles

- La méthode par chiffonnette donne des résultats équivalents mais elle est plus délicate à mettre en œuvre sur le bois, du fait du risque de déchirure sur la surface rugueuse.
- Une méthode par rabotage (semi-destructive) peut aussi être mise en œuvre pour s'assurer d'une absence de contamination (pathogènes par ex). Dans ce cas, il faudra raboter au minimum les 2 premiers millimètres sur une surface de 1500 cm²

Choix des zones à broser

Le nombre de zone à broser dépendra de l'objectif fixé :

- Dans le cas d'un contrôle de routine il faudra privilégier des planches témoins réparties dans la cave (une planche à mi-hauteur et si possible une tous les 10 mètres de longueur de cave).
- Dans le cas d'un contrôle de niveau de contamination ou d'efficacité de désinfection après une contamination, il faudra augmenter le nombre de surfaces et le nombre de planches.

Les zones les plus à risques sont les surfaces en contact avec les fromages donc les zones d'empreinte des fromages.

Les planches proches du sol constituent aussi un mode de prélèvement possible pour estimer le risque d'éclaboussures contaminantes.

Références bibliographiques

- ACTIA, 2004-2007.** Programme ACTIA RA.03.27. Chef de file : Actilait. Titre : Ecologie microbienne des planches d'affinage de fromages à croûte lavée. Caractérisation du biofilm microbien au cours du cycle d'affinage et interactions vis à vis de *Listeria monocytogenes*. Partenaires : Aérial, CTBA, UMR 763 INRA-AgroParisTech, LRGIA UCBL, SIR, CNAOL, Arilait Recherche, Entremont-Alliance, MÉTIS-Biotechnologie. Disponible auprès de l'ACTIA.
- ACTIA, 1997-2001.** Programme ACTIA RA.97.31 et RA.00.28. Chef de file : Actilait. Titre : Evaluation et maîtrise du risque microbiologique dans l'utilisation du bois pour l'affinage des fromages. Partenaires : Aérial, CTBA, IUT LARSA, ADRIAC, SEPPIC. Disponible auprès de l'ACTIA.
- Actilait-SIGF 2001.** Titre : Influence de la durée d'utilisation de planches d'affinage volontairement contaminées en flore indicatrice pathogène sur la persistance de l'efficacité des procédés de sanitation et sur le potentiel de contamination de fromages sains. Disponible auprès d'Actilait.
- Bosset JO., Sieber R. and Schmutz F. (1994).** De la présence et de l'origine des chlorophenols dans la croûte des fromages : un article de synthèse. Schweiz. Milchw. Forschung, 23, pp. 47-52.
- Bosset JO., Bütikofer U., Berger T. and Gauch R. (1997).** Etude des composés volatils du Vacherin fribourgeois et du Vacherin Mont d'or. Trav. Chim. Aliment. Hyg., vol 88, pp. 233-258.
- Dumont JP., Roger S., Cerf P. and Adda J. (1974).** Etude de composés volatils neutres présents dans le Vacherin. Lait, 54, pp. 243-251.
- Guillier L., Stahl V., Hezard B., Notz E. et Briandet R., 2008.** Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. Int. J. Food Micro., 128, 51-57.
- Mariani C., Briandet R., Chamba J.-F., Notz E., Carnet-Pantiez A., Eyoug R. N., and Oulahal N., 2007.** Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie. J. Dairy Sci. 90:1653-1661.
- Mohr Walter (1954).** Le nettoyage et la désinfection en laiterie. Publié en Allemagne en 1954 et traduit par Jean Pien et René Blanchet. Ed. Sep, Paris. 212 pages.
- Moser P., Collomb R., Steiner C. (1992).** *Serratia rubidaea* à l'origine de taches rouges sur des fromages à pâte molle. Schweiz. Milchw. Forschung, 21(2), 27-29.
- Schuler S. (1994).** Influence de différentes planches d'affinage sur la formation de la morge et la qualité des fromages à pâte mi-dure. Schweiz. Milchw. Forschung 23 (4), 73-77.

<p>Auteurs NOTZ Eric, Actilait, 39800 Poligny e.notz@actilait.com BERODIER Antoine, CTFC, 39800 Poligny a-berodier@ctfc.fr</p>		
---	--	--

RMT filières fromagères valorisant leur terroir



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

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.