

Étude prophylactique sur la pertinence des protocoles de désinfection utilisé sur les outils d'élagages : Résultats de la seconde phase.

Résumé

La désinfection à base de produits chimiques (Kontakt) à travers des protocoles en conditions réelles d'utilisation des outils d'élagage, a mis en évidence de très bonnes performances sur des charges fongiques et bactériennes (cf. article 1 lien vers le site SMDA). Pour ces raisons, nous avons voulu poser la question de la pérennisation des produits chimiques utilisés. La 2ème phase avait donc pour objectifs d'évaluer l'efficacité des produits de désinfections écologiques (vinaigre ménager et saumure) et de mesurer l'impact du broissage. Les résultats de l'étude parlent d'eux-mêmes. Les alternatives écologiques, bien que performantes et louables, ne permettent pas d'égaliser les performances de la désinfection chimique – toutes choses égales par ailleurs. En outre, l'efficacité réelle des procédures de broissage pose questions notamment sur les outils complexes et la mise en œuvre. Le constat de ces limites trouvera sa conclusion dans notre 3ème et ultime phase d'expérimentation qui a pour objectif de démontrer. Une nouvelle fois, notre pôle Recherche et Développement, clé dans la détermination de SMDA à innover, est en mesure de faire savoir et partager ses connaissances. Il ne s'agit absolument pas ici d'aller contre une volonté écologique mais d'une volonté d'appliquer un principe de protection du patrimoine arboré.
En savoir plus : [lien vers le site SMDA](#)

Mots clés : [Elagage](#) ; [Désinfection](#) ; [Prophylaxie](#) ; [Innovation](#)

Introduction

Les résultats encourageants de la première phase comparant plusieurs niveaux de désinfection, bien qu'apportant quelques éléments de réponse, soulevaient également de nombreuses questions. Dans cette seconde phase expérimentale, nous essayerons de répondre à une partie d'entre elles en cherchant notamment à éprouver l'impact des méthodes de désinfection ainsi que la viabilité des alternatives dites « écologiques » pouvant être proposées.

Facilement accessibles et économiques, les solutions « écologiques » produites avec des éléments du quotidien bénéficient aujourd'hui d'un tout nouvel intérêt en contexte de remise en question des produits chimiques. De manière générale, la plupart des microorganismes sont capables de tolérer de petits changements de paramètres dans leur environnement et peuvent s'adapter sur une échelle de temps pouvant varier de quelques minutes à quelques jours (Hill et al., 1995). En effet, soumis à des conditions de stress, ils sont capables, dans une certaine mesure, de prendre les dispositions nécessaires pour y survivre (Beales, 2004; Berry & Foegeding, 1997; Russell et al., 1995). Parmi les différentes variables à considérer, la température, l'activité de l'eau ou encore le pH sont connus et particulièrement utilisés dans l'industrie agroalimentaire par exemple. Cette dernière va de manière routinière les utiliser pour inhiber ou détruire les micro-organismes ainsi que leurs spores et sont logiquement utilisés comme aide à la conservation des aliments (Marechal et al., 1999).

Les protocoles à base de vinaigre ménagers proposés par exemple par Plante & Cité, 2018 ou encore la Mairie de Paris (Cf. *Fiche d'Usages Pour La Substance de Base Vinaigre*, 2015) joue sur la propriété des acides lipophile faible, ici l'acide acétique, pour diminuer

l'activité microbienne grâce à un faible pH (Pilkington & Rose, 1988; Restaino et al., 1982; Sofos & Busta, 1981). En règle générale, les bactéries et les levures maintiennent leur pH interne (pH_i) autour de la neutralité (Salmond et al., 1984), ce qui est essentiel pour l'activité optimale de nombreux processus cellulaires importants (Madshus, 1988; Sofos & Busta, 1981). En rencontrant un pH plus élevé à l'intérieur de la cellule, les acides faibles se dissocient et libèrent des ions H^+ faisant ainsi baisser le pH_i de la cellule (Vasseur et al., 1999). D'un point de vue physiologique, la perturbation de l'homéostasie du pH_i des cellules perturbe le transport des substrats et entrave les voies métaboliques. Cette capacité étonnante à inactiver ou interférer avec la membrane cellulaire, la paroi cellulaire, les enzymes métaboliques, le système de synthèse des protéines ou encore le matériel génétique (Beales, 2004; Krebs et al., 1983; Warth, 1985) leur confère, entre autres, des propriétés fongistatiques ou bactériostatiques.

Dans un autre registre, les protocoles à base de sel, le plus souvent conditionnés sous forme de saumure extrêmement concentrée tels que décrit par exemple par Somani et al., 2011 ou encore Wijker et al., 2006 utilisent d'autres voies physiologiques. Événement clé dans l'évolution, le développement de la membrane cytoplasmique semi-perméable fournit un espace confiné pour la copie du matériel génétique et un récipient de réaction avec des conditions optimisées pour les fonctions cellulaires clés (Spitzer & Poolman, 2009; Wood, 1999). Le cytoplasme, cette substance gélatineuse constituant la cellule, possède un potentiel osmotique considérable en raison des concentrations élevées de ses divers constituants (Gutierrez et al., 1995; van den Berg et al., 2017; Wood, 2011). Par osmose, un afflux d'eau du milieu externe dans la cellule va provoquer une pression hydrostatique garantissant la turgescence et donc le bon fonctionnement de la cellule (Wood, 2011; Wood et al., 2001). Pour ces raisons, les variations de l'osmolalité de l'environnement est l'un des facteurs de stress les plus rencontrés par les microorganismes dans leurs habitats (Csonka, 1989; Kempf & Bremer, 1998; Pade & Hagemann, 2014; Roessler & Müller, 2001; R. Sleator, 2001; Wood, 2011; Wood et al., 2001). Tout comme le pH, la plupart des organismes ont évolué pour ne fonctionner que dans certaines plages d'activités de l'eau (a_w) et des valeurs en dehors de cette plage peuvent entraîner des altérations des fonctions cellulaires essentielles et inhiber divers processus physiologiques tels que l'absorption des nutriments (Cheroutre-Vialette et al., 1998; Roth et al., 1985; Sperber, 1983). Or l'utilisation de sel se traduit par la diminution de l' a_w pour le microorganisme (Csonka, 1989; Galinski & Trüper, 1994; Gutierrez et al., 1995; Kempf & Bremer, 1998; Sperber, 1983). Dans de telles conditions, la sortie de l'eau dans des conditions hyperosmotiques déclenche une déshydratation cytoplasmique et une chute de la turgescence de la cellule à des valeurs physiologiquement non soutenables (Bremer & Krämer, 2019; Wood, 2011).

Avec le vivant comme sujet de travail, les outils d'élagage sont exposés à une large variété de produits biologiques qui peuvent s'agglomérer en surface ou s'incruster dans les différents mécanismes. Ces amalgames de poussières, de matériel végétal et d'huile de graissage constitue un véritable réservoir de biodiversité microbienne et constitue un véhicule de diffusion privilégié de ces microorganismes. Pour ces raisons, dans le cas de pathogènes hautement virulents comme le chancre coloré du platane, les méthodes prophylactiques recommandées insistent sur la suppression d'un maximum de ces résidus, le plus souvent par brossage (Plante & Cité, 2018). Dans cette étude, nous avons donc deux objectifs :

1. Évaluer l'efficacité des produits de désinfection écologiques.
2. Sur la base des traitements réalisés, évaluer l'impact d'un brossage.

Matériel & Méthode

Support d'étude

Outil emblématique de l'activité arboricole, la tronçonneuse est une mécanique complexe dont le fonctionnement naturel, en particulier celui de la lubrification de ces différents éléments, est favorable au développement des micro-organismes. En condition normal d'utilisation, cette dernière va favoriser avec la chaleur générée, l'huile et la sciure, des amalgames complexes et difficiles à traiter qui sont de véritables incubateurs microbiologiques.

Pour analyser cette faune commensale à l'activité d'élagage, nous avons demandé à nos équipes de nous fournir leurs engins. Ces derniers devaient remplir deux conditions. La première était que les tronçonneuses devaient avoir servies récemment afin d'être exposées aux différents contaminants d'une journée de travail typique. La seconde était que ces outils ne devaient avoir subi aucune opération de désinfection afin de nous restituer cette charge microbiologique collectée intacte pour analyse.

Traitements réalisés

Dans le cadre de cette deuxième phase expérimentale, nous testerons contre témoin l'impact de deux traitements écologiques, l'un à base de vinaigre ménager, l'autre à base de sel conditionné en saumure. La réalisation des deux solutions a été faite le jour même des prélèvements à partir d'eau de qualité milli-Q.

La solution à base de vinaigre a été réalisée sur la base des recommandations de la Mairie de Paris (Cf. *Fiche d'Usages Pour La Substance de Base Vinaigre*, 2015). Ce protocole consiste, à partir de vinaigre ménager pur à 8% d'acidité, à réaliser une dilution au 1/20 soit 50ml de vinaigre pour 1l d'eau. Dans le cadre de la réalisation de saumure très concentrée, le retour d'expérience offert par l'industrie agro-alimentaire a souvent mis en avant la capacité de certains micro-organismes comme *Listeria monocytogenes* à survivre à des saumures pourtant très concentrée à 10% (Cheroutre-Vialette et al., 1998; Nolan et al., 1992; R. D. Sleator et al., 2003; Vasseur et al., 1999; Wood et al., 2001). Dans le cas de notre étude, n'ayant pas d'impératif de comestibilité, nous avons décidé de doubler la concentration en réalisant une saumure à 20% en diluant 200g de sel dans 1l d'eau.

Ces deux traitements écologiques seront testés avec et sans brossage contre témoin ce qui nous fait un total de 5 traitements (Cf. Tableau 1). Un total de trois essais sera réalisé par traitements ce qui nous fait un total de 15 échantillons pour l'étude.

n°1	Témoin	
n°2	Vinaigre	Sans Brossage
N°3	dilué au 1/20	Avec Brossage
n°4	Saumure à 20%	Sans Brossage
n°5		Avec Brossage

Tableau 1 : Liste des traitements réalisés.

Méthode de prélèvement écologique

Les prélèvements faits sur les machines ont été réalisés en interne sur les guides des tronçonneuses et analysés par un laboratoire indépendant accrédité de la société Eurofins. Pour effectuer ces prélèvements et conformément à leurs recommandations, nous avons procédé en suivant le protocole (Cf. Annexe 1) ainsi qu'en utilisant le matériel de prélèvement

fourni. A l'aide d'un écouvillon ATL stérile immergé dans une solution de sels de Tryptone et d'un neutralisant, nous avons effectué une collecte des organismes sur un carré de 5 cm de côté pour une surface totale de 25 cm². Nous avons procédé à deux passages en quinconces perpendiculaires en faisant tourner délicatement les écouvillons pour bien jouer sur l'ensemble de leur surface de prélèvement.

Les 9 échantillons ainsi prélevés ont été consciencieusement conditionnés pour le transport et expédiés le jour même dans un colis réfrigéré puis perçus dans les 48h par le laboratoire d'analyse afin de garantir la meilleure fraîcheur possible pour les analyses.

Dénombrement

Effectué par le laboratoire indépendant de la société Eurofins, le dénombrement bactérien et fongique met en place le même protocole. Une série de dilutions successives est effectuée pour chaque échantillon à partir de la solution mère issue du prélèvement. La solution mère et chacune de ses dilutions filles sont ensuite étalées sur une gélose, non sélective pour la quantification bactérienne, sélective pour la quantification fongique. Les boîtes de pétri ainsiensemencées sont mises à incubation à une température de 22°C pour une durée de 3 jours dans le cas des quantifications bactériennes contre 5-7 jours pour les quantifications fongiques.

A l'issue de cette incubation, les « *Unités Formants Colonies* » (U.F.C.) sont comptabilisées dans les boîtes les plus représentatives. La charge initiale est obtenue en multipliant le résultat de ce dénombrement par le facteur de dilution.

Résultats

Les résultats des dénombrements de l'expérience sont présentés dans le

Traitement			Bactériologie						
n°	Identifiant	Brossage	Charge totale	Charge.cm ⁻¹	Moyenne	E.type	Charge Bactérienne	Charge totale	Charge.cm ⁻¹
Contrôles									
1	Témoin n°1	*	96000	3840				7600	304
2	Témoin n°2	*	240000	9600	4693,33	4541	100,00%	20000	800
3	Témoin n°3	*	16000	640				680	27,2
Protocoles écologiques									
4	Vinaigre n°1	*	28000	1120				800	32
5	Vinaigre n°2	*	17000	680	900	311	-80,82%	400	16
6	Vinaigre n°3	*	NA	NA				4000	160
7	Vinaigre n°4	✓	0	0				40	1,6
8	Vinaigre n°5	✓	840	33,6	11,2	19,4	-99,76%	320	12,8
9	Vinaigre n°6	✓	0	0				40	1,6
10	Saumure n°1	*	53000	2120				6000	240
11	Saumure n°2	*	32000	1280	2306,67	1132	-50,85%	4000	160
12	Saumure n°3	*	88000	3520				NA	NA
13	Saumure n°4	✓	0	0				0	0
14	Saumure n°5	✓	0	0	0	0	-100,00%	40	1,6
15	Saumure n°6	✓	0	0				0	0

Tableau 2.

Les traitements écologiques

Les deux traitements semblent avoir un effet significatif sur la charge microbiologique. En effet, on peut remarquer des baisses substantielles du nombre de bactéries ou de spores fongiques par cm² que l'on considère le traitement de vinaigre ou celui à base de saumure concentrée. Également, que l'on considère le traitement à base de vinaigre ou celui à base de saumure concentrée, on constate que dans les deux cas les diminutions des charges fongiques ou bactériennes se font avec une efficacité comparable. Toutefois, les expériences mettent aussi en évidence de meilleurs résultats de la solution à base de vinaigre.

Avec une charge bactérienne moyenne de 900 unités/cm² contre la charge moyenne de près de 4700 unités/cm² observées sur le témoin, nous remarquons que ce protocole permet déjà d'obtenir une diminution effective de plus de 80%. Cette bonne performance globale se retrouve également au niveau fongique puisque la charge moyenne de 69.3 unités/cm² observées contre la charge moyenne de 377.1 unités/cm² observées sur le témoin représente une diminution effective de la charge fongique de presque 82%.

En comparaison, les résultats obtenus par une saumure très concentrée, bien que très respectables, mettent en avant une efficacité moindre. Le dénombrement de la charge bactérienne moyenne de presque 2307 unités/cm² et de la charge fongique moyenne de 200 unités/cm² représentent par rapport à notre expérience témoin une baisse de respectivement presque 51% et 47%.

Les effets du brossage

Pour les traitements ajoutant une étape de brossage, les résultats montrent des performances comparables des traitements utilisant une dilution de vinaigre et une saumure très concentrée. En effet, que l'on considère la charge bactérienne ou fongique, les deux traitements donnent une réduction effective presque totale en tendant vers l'asepsie.

Si l'on considère le vinaigre, les traitements brossés présentent des profils moyens 11.2 unités/cm² pour la charge bactérienne et de 5.3 unités/cm² pour la charge fongique. Dans le cas du traitement par saumurage et brossage, les profils moyens sont respectivement de 0 et 0.5 unités/cm² pour les profils bactériens et fongiques. Par rapport aux profils moyens de l'expérience témoin, les diminutions des traitements brossés de presque 99.8% pour le vinaigre et de 100% pour la saumure en ce qui concerne les profils bactériens. Des observations similaires sont faites sur les profils fongiques puisque ces mêmes traitements constituent une diminution de la charge fongique de presque 98.6% pour le premier traitement et de presque 99.9% pour le second traitement. Il y a donc un effet significatif du brossage puisqu'il nous permet d'accroître très fortement les effets des traitements.

Traitement			Bactériologie					Mycologie				
n°	Identifiant	Brossage	Charge totale	Charge.cm ⁻¹	Moyenne	E.type	Charge Bactérienne	Charge totale	Charge.cm ⁻¹	Moyenne	E.type	Charge Fongique
Contrôles												
1	Témoin n°1	✘	96000	3840				7600	304			
2	Témoin n°2	✘	240000	9600	4693,33	4541	100,00%	20000	800	377,067	392	100,00%
3	Témoin n°3	✘	16000	640				680	27,2			
Protocoles écologiques												
4	Vinaigre n°1	✘	28000	1120				800	32			
5	Vinaigre n°2	✘	17000	680	900	311	-80,82%	400	16	69,3333	78,9	-81,61%
6	Vinaigre n°3	✘	NA	NA				4000	160			
7	Vinaigre n°4	✔	0	0				40	1,6			
8	Vinaigre n°5	✔	840	33,6	11,2	19,4	-99,76%	320	12,8	5,33333	6,47	-98,59%
9	Vinaigre n°6	✔	0	0				40	1,6			
10	Saumure n°1	✘	53000	2120				6000	240			
11	Saumure n°2	✘	32000	1280	2306,67	1132	-50,85%	4000	160	200	56,6	-46,96%
12	Saumure n°3	✘	88000	3520				NA	NA			
13	Saumure n°4	✔	0	0				0	0			
14	Saumure n°5	✔	0	0	0	0	-100,00%	40	1,6	0,53333	0,92	-99,86%
15	Saumure n°6	✔	0	0				0	0			

Tableau 2 : Résultats des dénombrements microbiologiques

Discussion

Les méthodes écologiques à relativiser

Dans son étude Neipp (1946) relativisait l'action des saumures en considérant que ces dernières ne pouvaient constituer « un rôle prépondérant » dans la désinfection des instruments ou la stérilisation de l'eau. Sur le principe, la déshydratation générée par une saumure très concentrée est souvent un processus chronophage. Par exemple, Somani et al., (2011) ont estimé dans leur étude l'action d'une saumure concentrée à 10% sur une population de bactéries coliformes (*Escherichia coli*). Les résultats obtenus mettent en évidence un temps de contact pour obtenir un effet maximal de 80% de minimum 30 min. Plus largement, les retours d'expérience issus de l'industrie agro-alimentaire (Cheroutre-Vialette et al., 1998; Wijker et al., 2006) mettent également en évidence ce type de cinétique au détail près que les concentrations utilisées étant moindre, les temps d'exposition se comptent plutôt en jours qu'en minutes. Dans de telles conditions, il n'est donc pas envisageable d'étendre ce type de protocole aux milieux de l'espace vert au risque de perdre en efficacité.

Le protocole au vinaigre a donné des résultats tout à fait convenables avec un pouvoir désinfectant de l'ordre de 80%. Contrairement à la saumure, le vinaigre offre un pouvoir désinfectant relativement rapidement et cette caractéristique essentielle permet effectivement de l'envisager en alternative aux protocoles standards utilisant des produits chimiques. Malgré tout, même si les performances constatées sont très honorables, il apparaît que ces dernières ne sont pas au niveau de ce que les produits chimiques sont capables d'offrir. En effet, les résultats de cette étude sont à nuancer avec ceux de la phase précédente. La nature même du protocole, par la stricte répétabilité de la méthode de prélèvement, fait qu'il est possible d'assembler les résultats obtenus afin d'avoir une vision d'ensemble plus juste. Cet assemblage est présenté dans le Tableau 3.

Cette nouvelle perspective vient fortement pondérer les résultats donnés précédemment. Les nouvelles valeurs observées pour les charges bactériennes et fongiques prises par les témoins nous permettent de reconsidérer le niveau d'efficacité de chaque traitement. Ainsi ces nouvelles données mettent en avant le fort pouvoir désinfectant des méthodes chimiques, ces dernières offrant des résultats de quasi asepsie que l'on effectue un brossage ou non. Par opposition, de tels niveaux de performances ne peuvent être atteints avec les méthodes écologiques que par l'application d'un brossage, sans ce dernier les résultats sont beaucoup plus faibles. En effet, avec une efficacité sur le bactérien de l'ordre de 63% et sur le fongique de l'ordre de 78% en ce qui concerne le vinaigre, on remarque que l'action désinfectante, bien que non négligeable, laisse une charge microbiologique résiduelle importante. Cette observation se retrouve dans une plus large mesure avec la saumure puisque cette dernière est quasiment incapable d'enlever la charge bactérienne (5% d'efficacité à peu près) et laisse une large proportion de la charge fongique (38% d'efficacité à peu près).

Traitement			Bactériologie				Mycologie					
n°	Identifiant	Brossage	Charge totale	Charge.cm ⁻¹	Moyenne	E.type	Charge Bactérienne	Charge totale	Charge.cm ⁻¹	Moyenne	E.type	Charge Fongique
Contrôles												
1	Témoin n°1	✘	1800	72,00				0	0,00			
2	Témoin n°2	✘	240	9,60				0	0,00			
3	Témoin n°3	✘	12000	480,00	2440,27	3790,03	100,00%	20000	800,00	321,87	387,70	100,00%
4	Témoin n°4	✘	96000	3840,00				7600	304,00			
5	Témoin n°5	✘	240000	9600,00				20000	800,00			
6	Témoin n°6	✘	16000	640,00				680	27,20			
Protocoles chimiques												
7	Kontakt® n°1	✘	1600	64,00				40	1,60			
8	Kontakt® n°2	✘	1100	44,00	49,33	12,86	-97,98%	280	11,20	4,27	6,06	-98,67%
9	Kontakt® n°3	✘	1000	40,00				0	0,00			
10	Virkon® n°1	✔	0	0,00				0	0,00			
11	Virkon® n°2	✔	80	3,20	1,60	1,60	-99,93%	40	1,60	0,53	0,92	-99,83%
12	Virkon® n°3	✔	40	1,60				0	0,00			

Protocoles écologiques

13	Vinaigre n°1	*	28000	1120,00				800	32,00			
14	Vinaigre n°2	*	17000	680,00	900,00	311,13	-63,12%	400	16,00	69,33	78,93	-78,46%
15	Vinaigre n°3	*	NA	NA				4000	160,00			
16	Vinaigre n°4	✓	0	0,00				40	1,60			
17	Vinaigre n°5	✓	840	33,60	11,20	19,40	-99,54%	320	12,80	5,33	6,47	-98,34%
18	Vinaigre n°6	✓	0	0,00				40	1,60			
19	Saumure n°1	*	53000	2120,00				6000	240,00			
20	Saumure n°2	*	32000	1280,00	2306,67	1131,61	-5,47%	4000	160,00	200,00	56,57	-37,86%
21	Saumure n°3	*	88000	3520,00				NA	NA			
22	Saumure n°4	✓	0	0,00				0	0,00			
23	Saumure n°5	✓	0	0,00	0,00	0,00	-100,00%	40	1,60	0,53	0,92	-99,83%
24	Saumure n°6	✓	0	0,00				0	0,00			

Tableau 3 : Assemblage des résultats de la phase n°1 et de la phase n°2.

L'étude a pu également mettre en évidence l'accroissement significatif de l'efficacité du brossage. En effet, quelle que soit la solution considérée, les résultats approchent l'asepsie sur des niveaux tout à fait équivalents au protocole avancé par immersion dans le Virkon® et brossage présenté en phase n°1. Il faut toutefois relever que la logistique à mettre en place pour de tels protocoles est loin d'être anodine. En effet, les ressources logistiques requises pour mettre en place de telles procédures dans un cadre opérationnel se traduiraient inévitablement par des répercussions financières et de productivité. Par ailleurs, la réalité du terrain est souvent bien différente des conditions privilégiées offertes par un laboratoire. En effet, cette étude s'est contentée de faire des prélèvements sur les guides, surfaces plates et homogènes, des tronçonneuses. Or ces outils sont beaucoup plus complexes que cela et les multiples pièces en mouvements, les engrenages et les différents assemblages constituent autant de bastions microbiologiques qu'il est pratiquement impossible d'atteindre par un brossage manuel classique. Par conséquent, dans le cas de pathogène très infectieux comme le chancre coloré du platane, contaminant à partir d'inoculum extrêmement faible de 200 spores par blessures (Vigouroux, 1992), il sera nécessaire de procéder à un démontage de l'outil pour faire un nettoyage en profondeur.

D'un point de vue opérationnel cela implique d'avoir plusieurs jeux d'outils afin de faire un roulement et d'avoir une équipe entièrement dédiée à la mise en application de ces protocoles. Dans une autre optique, cela remet également en question davantage les méthodes écologiques. En effet, considérant qu'il subsisterait des endroits difficiles d'accès ne pouvant être brossés, cela se traduirait par une efficacité de la technique probablement moins importante. Il y aurait donc une différence fondamentale entre l'efficacité apparente observée au laboratoire, et l'efficacité réelle où tous les recoins des outils complexes auraient un niveau de désinfection plus proche de ce que nous avons pu obtenir sans brossage. La capacité biocide intrinsèque du produit se révèle donc fondamentale dans le cas de gestion de foyers hautement infectieux. De plus, ce même constat soulève également la question de la charge microbologique contenue dans les effluents des produits écologiques qu'il faudrait gérer avec une précaution toute particulière, ces derniers étant potentiellement contaminés beaucoup plus fortement que les effluents chimiques.

Il y a donc une véritable réflexion à mener sur la pertinence de mettre en place une procédure complexe avec brossage. Le nombre de variables à considérer implique que ces procédures doivent faire partie d'un niveau de prestation supérieur à considérer par exemple dans la gestion de foyers chancreux ou d'arbres particulièrement remarquables. Dans le cas de gestion courante du patrimoine, le respect des procédures standards avec un produit adapté permet déjà d'offrir des performances très acceptables.

Conclusions & perspectives

Les protocoles écologiques testés dans cette étude ont montré des résultats significatifs tant sur la charge fongique que bactérienne. D'un point de vue performance, le protocole utilisant une solution à base de vinaigre a donné de meilleurs résultats avec un taux de désinfection fongique et bactérien de l'ordre de 80% tandis que la saumure très concentrée a montré des résultats beaucoup plus contrastés avec des taux de désinfection fongiques et bactériens autour de 50%. Rapportées à l'expérimentation précédente, les solutions écologiques ne semblent toutefois pas fournir le même niveau de performance que les méthodes chimiques tout en exigeant une logistique plus robuste nécessaire à leur fabrication (Cf. Tableau 4).

Produits	Pulvérisation		Brossage	
	Bactérien	Fongique	Bactérien	Fongique
Chimique	-97,98%	-98,67%	-99,93%	-99,83%
Vinaigre	-63,12%	-78,46%	-99,54%	-98,34%
Saumure	-5,47%	-37,86%	-100,00%	-99,83%

Tableau 4 : Extrait du Tableau 3 présentant les niveaux d'efficacité de chaque méthode.

Par ailleurs, le brossage a montré un effet significatif quel que soit le produit utilisé. En effet, malgré l'utilisation de produits écologiques, nous avons pu obtenir un niveau de désinfection frôlant l'asepsie. L'action mécanique par brossage semble donc avoir une importance considérable pour atteindre les meilleures performances indépendamment du produit considéré. Malgré tout, les limites soulevées dans l'article précédent à savoir la logistique complexe que cela implique d'une part, et les limites soulevées dans cette étude sur l'efficacité réelle d'autre part ne permet pas à ce jour de considérer les protocoles écologiques comme des alternatives offrant les mêmes niveaux de performance que les produits professionnels utilisés. En revanche, leur nature démocratique peut constituer une bonne solution de secours dans le cas où l'accès aux produits professionnels est restreint ou si leurs approvisionnements sont compliqués.

Enfin, les perspectives de la phase n°1 mettaient en avant le fait d'étudier le transfert de la charge microbiologique sur une plaie lors d'une taille. Cette dernière question sera étudiée lors de la prochaine et dernière phase de cette expérimentation.

Bibliographie

- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 1–20.
- Berry, E. D., & Foegeding, P. M. (1997). Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection*, 60(12), 1583–1594. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.12.1583>
- Bremer, E., & Krämer, R. (2019). Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 313–334. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115504>
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., & Šebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 32(1), 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>
- Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J. ., & Lebert, A. (1998). Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00064-6)
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53(1), 121–147. <https://doi.org/10.1128/mr.53.1.121-147.1989>
- Fiche d'Usages pour la Substance de Base Vinaigre.* (2015).
- Galinski, E. A., & Trüper, H. G. (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(2–3), 95–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x>
- Gutierrez, C., Abee, T., & Booth, I. R. (1995). Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 233–244. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00059-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00059-3)
- Hill, C., O'Driscoll, B., & Booth, I. (1995). Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00060-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00060-7)
- Kempf, B., & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>
- Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., & Bedoya, F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*, 214(3), 657–663. <https://doi.org/10.1042/bj2140657>
- Madshus, I. H. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochemical Journal*, 250(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/bj2500001>
- Marechal, P. A., Martínez de Marnañón, I., Poirier, I., & Gervais, P. (1999). The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00012-6)
- Neipp, L. (1946). Contribution à l'étude de l'influence du chlorure de sodium sur l'action désinfectante. *Pathobiology*, 9(1), 66–87.
- Nolan, D. A., Chamblin, D. C., & Troller, J. A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 16(4), 323–335. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90034-Z](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90034-Z)
- Pade, N., & Hagemann, M. (2014). Salt Acclimation of Cyanobacteria and Their Application in Biotechnology. *Life*, 5(1), 25–49. <https://doi.org/10.3390/life5010025>
- Pilkington, B. J., & Rose, A. H. (1988). Reactions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* to Sulphite. *Microbiology*, 134(10), 2823–2830.

- <https://doi.org/10.1099/00221287-134-10-2823>
- Plante & Cité. (2018). *Chancre coloré du platane : Guide de bonnes pratiques pour la lutte*.
- Restaino, L., Lenovich, L. M., & Bills, S. (1982). Effect of Acids and Sorbate Combinations on the Growth of Four Osmophilic Yeasts. *Journal of Food Protection*, *45*(12), 1138–1142. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.12.1138>
- Roessler, M., & Müller, V. (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology*, *3*(12), 743–754. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00252.x>
- Roth, W. G., Porter, S. E., Leckie, M. P., Porter, B. E., & Dietzler, D. N. (1985). Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically upshocked *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *126*(1), 442–449. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90625-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90625-4)
- Russell, N. J., Evans, R. I., ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A., & Abee, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, *28*(2), 255–261. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00061-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00061-5)
- Salmond, C. V., Kroll, R. G., & Booth, I. R. (1984). The Effect of Food Preservatives on pH Homeostasis in *Escherichia coli*. *Microbiology*, *130*(11), 2845–2850. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-11-2845>
- Sleator, R. (2001). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(5), 49–71. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00071-7)
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2003). A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.1-9.2003>
- Sofos, J. N., & Busta, F. F. (1981). Antimicrobial Activity of Sorbate. *Journal of Food Protection*, *44*(8), 614–622. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.8.614>
- Somani, S. B., Ingole, N. W., & Kulkarni, N. S. (2011). Disinfection of Water by using Sodium Chloride (NaCl) and Sodium Hypochlorite (NaOCl). *Journal of Engineering Research*, *2*(4), 40–43. [http://www.technicaljournalonline.com/jers/VOL II/JERS VOL II ISSUE IV OCTOBER DECEMBER 2011/ARTICLE 9 JERS VOLII ISSUE IV OCT DEC 2011.pdf](http://www.technicaljournalonline.com/jers/VOL%20II/JERS%20VOL%20II%20ISSUE%20IV%20OCTOBER%20DECEMBER%202011/ARTICLE%209%20JERS%20VOL%20II%20ISSUE%20IV%20OCT%20DEC%202011.pdf)
- Sperber, W. H. (1983). Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria : A Review. *Journal of Food Protection*, *46*(2), 142–150. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.142>
- Spitzer, J., & Poolman, B. (2009). The Role of Biomacromolecular Crowding, Ionic Strength, and Physicochemical Gradients in the Complexities of Life's Emergence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *73*(2), 371–388. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-09>
- van den Berg, J., Boersma, A. J., & Poolman, B. (2017). Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(5), 309–318. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.17>
- Vasseur, C., Baverel, L., Hebraud, M., & Labadie, J. (1999). Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(3), 469–476. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00686.x>
- Vigouroux, A. (1992). Preliminary results for obtaining a plane tree resistant to canker stain and adapted to European conditions. *Acta Horticulturae*, *320*, 91–96. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.320.12>
- Warth, A. D. (1985). Resistance of Yeast Species to Benzoic and Sorbic Acids and to Sulfur Dioxide. *Journal of Food Protection*, *48*(7), 564–569. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.7.564>
- Wijnker, J. J., Koop, G., & Lipman, L. J. A. (2006). Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology*, *23*(7), 657–662. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.11.004>
- Wood, J. M. (1999). Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors.

- Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 230–262.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.230-262.1999>
- Wood, J. M. (2011). Bacterial Osmoregulation: A Paradigm for the Study of Cellular Homeostasis. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 215–238.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102815>
- Wood, J. M., Bremer, E., Csonka, L. N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T., & Smith, L. T. (2001). Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 130(3), 437–460. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00442-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00442-1)

Annexes



Protocole de prélèvement d'une surface à l'aide d'un écouvillon pour la réalisation d'analyses microbiologiques

Matériel fournit :

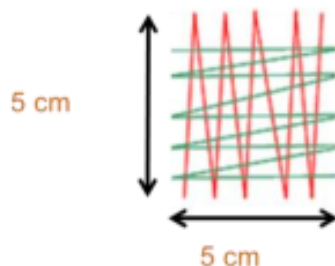
Écouvillon ATL avec 4 mL de liquide recueil (Tryptone sel + neutralisant)

Utilisation :

L'écouvillon est utilisé dans le but de réaliser des prélèvements de surface en vue d'analyses microbiologiques.

Instructions :

1. Se désinfecter les mains à l'aide d'un eau savonneuse ou d'un gel hydroalcoolique.
2. Ouvrir le tube contenant l'écouvillon et le liquide de recueil. Ne toucher que les parties extérieures du bouchon bleu et du tube contenant le liquide de recueil.
3. Retirer l'écouvillon du liquide. Éliminer le surplus de liquide présent sur l'embout en « mousse » de l'écouvillon en le pressant légèrement sur la paroi intérieure du tube contenant le liquide de recueil (attention à ne pas assécher totalement l'écouvillon).
4. Si le prélèvement est réalisé sur une surface plane, il est recommandé que cette surface ait une dimension de 25 cm², par exemple un carré de 5 cm sur 5 cm.
 - a. Réaliser le prélèvement en frottant la totalité de la surface avec l'embout de l'écouvillon en exerçant une pression constante. Pendant l'écouvillonnage faire tourner doucement l'écouvillon afin que la totalité de la surface de l'embout participe au prélèvement. L'écouvillon doit être incliné avec un angle d'environ 30° par rapport à la surface prélevée.
 - b. Faire un premier passage en faisant des stries parallèles de haut en bas sur 5 cm
 - c. Attendre 10 secondes et faire un second passage en faisant des stries parallèles de gauche à droite sur 5 cm.



Si la surface de prélèvement ne permet pas réaliser un prélèvement de 5 cm sur 5 cm alors réaliser le prélèvement en frottant la totalité de la surface avec l'embout de l'écouvillon en



Version 1.2 du 21-04-2021

exerçant une pression constante. Pendant l'écouvillonnage faire tourner doucement l'écouvillon afin que la totalité de la surface de l'embout participe au prélèvement.

5. A la fin de l'écouvillonnage, replacer l'écouvillon dans le tube contenant le liquide de recueil et revisser le bouchon.

Il est impératif pour la stabilité du prélèvement que le tube contenant l'écouvillon soit fermé hermétiquement afin d'éviter son assèchement.

6. Indiquer le libellé de l'échantillon sur le tube à l'aide d'un feutre waterproof.
7. Placer le tube dans un sachet ZIP.
8. Recommencer à l'étape 1 pour les prélèvements suivants.
9. Mettre le colis, la demande d'analyses regroupant l'ensemble des informations de prélèvement.
10. Le transport des échantillons doit se faire en conditions réfrigérées. Les échantillons doivent être envoyés au laboratoire d'analyse pour une réception le lendemain du prélèvement à l'adresse suivante :

Eurofins Expertise Microbiologique France
Rue Lucien Cuénot / Site St Jacques II
54320 MAXEVILLE

Les prélèvements sont à réaliser du lundi au jeudi pour une réception au plus tard le vendredi au laboratoire.