

PiloTraite, un outil innovant pour étudier les biofilms des machines à traire

L'outil PiloTraite constitue le chaînon manquant entre le laboratoire et les exploitations laitières bovines, ovines et caprines. Situé dans le laboratoire Traite et compteurs à lait de la ferme expérimentale laitière de Derval (44), ce pilote permet de mener des études sur les liens entre la traite et la qualité du lait. Une application possible concerne les biofilms, notamment l'étude des procédures de leur implantation dans une installation de traite et de leur destruction.



UNE MACHINE À TRAIRE PILOTE UNIQUE AU MONDE, AU SERVICE DE LA QUALITÉ DU LAIT

PiloTraite est une machine à traire pilote, située à l'interface entre le laboratoire et le terrain. Elle permet d'effectuer des expérimentations sur la traite de manière contrôlée, puisqu'il n'est pas nécessaire de traire des animaux. Ainsi, il est possible de s'affranchir de la variabilité animale et de répéter les expériences dans les mêmes conditions. En remplacement des animaux, 4 mamelles artificielles sont utilisées et peuvent être adaptées pour correspondre aux mamelles d'une vache, d'une brebis ou d'une chèvre. PiloTraite se compose donc de 4 postes de traite avec griffe et plateau de lavage, et possède les principaux organes retrouvés sur une machine à traire classique (chambre de réception,

piège sanitaire, bac de lavage, etc.). Entièrement paramétrable, elle permet de reproduire toutes les situations de traite rencontrées en élevage.

Le pilote est un des constituants majeurs de la plateforme TRET (Transfert Recherche et Expertise autour de la Traite), située sur la ferme expérimentale de Derval. Sous la propriété de l'Institut de l'élevage, il a été co-financé par l'entreprise Kersia, spécialiste des produits de nettoyage en élevage, dans le cadre d'un projet CASDAR. Les essais sur le pilote sont conduits et gérés par le personnel de l'Institut de l'élevage habilité à manipuler l'outil. Les partenaires ayant participé à la conception de PiloTraite bénéficient par ailleurs de conditions

financières avantageuses pour utiliser l'outil.

De nombreuses thématiques autour de la traite et en lien avec la qualité du lait peuvent ainsi être étudiées grâce à PiloTraite. Cela inclut par exemple, la qualité microbiologique du lait cru ou encore ses aptitudes technologiques. Les premières expérimentations sur PiloTraite ont permis de définir les conditions d'utilisation du pilote pour étudier les biofilms dans la machine à traire. Ainsi, différentes modalités d'implantation, de prélèvement et de destruction des biofilms ont été testées et certaines ont permis d'aboutir à des procédures standardisées.

ZOOM SUR LES ÉLÉMENTS DE PILOTRAITE

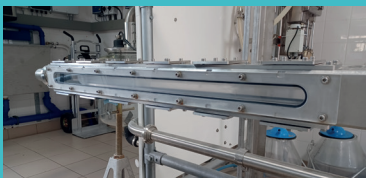
• UNE MACHINE A TRAIRE PILOTE QUI PERMET DE REPRODUIRE LES SITUATIONS DE TRAITE EN ELEVAGE



• DES PARTIES TRANSPARENTES POUR VISUALISER, MIEUX COMPRENDRE L'ÉCOULEMENT DU LAIT ET DES SOLUTIONS DE NETTOYAGE



• UN DISPOSITIF PORTE-COUPONS SPÉCIFIQUE POUR ÉTUDIER LES BIOFILMS



• UN SYSTÈME DE TRAITEMENT DE L'EAU POUR ASSURER SA QUALITÉ



PARTIE 1 : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODOLOGIE POUR L'ÉTUDE DES BIOFILMS VIA PILOTRAITE

PiloTraite est un outil unique pour accroître les connaissances sur la maîtrise des biofilms. Une procédure d'utilisation pour ce type d'étude a donc été mise au point. Elle comporte 2 volets :

- la mise au point d'une procédure de nettoyage/désinfection du pilote préalablement à toute mise en place d'étude ;
- la connaissance de la cinétique d'implantation d'un biofilm dans une installation de traite.

ETAPE 1 : MISE AU POINT D'UNE PROCÉDURE DE NETTOYAGE ET DÉSINFECTION DU PILOTE POUR DÉTRUIRE LES BIOFILMS PRÉSENTS

Avant d'implanter un biofilm dans le pilote, celui-ci doit être nettoyé afin d'éliminer toute souillure organique et désinfecté pour limiter les biais de l'analyse microbiologique. Différents protocoles ont été testés sur un circuit test au niveau de la halle technologique d'ACTALIA, puis sur le dispositif porte-coupons et enfin sur le pilote. L'utilisation d'un détergent enzymatique a été expérimentée mais a entraîné la formation d'une quantité importante de mousse dans le pilote et n'a donc pas été retenue. Le protocole finalement validé comporte 3 phases (voir figure 1) :

1. Détergence et désinfection alcaline
2. Détartrage acide
3. Désinfection finale

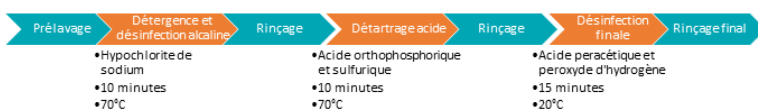


FIGURE 1 : PROTOCOLE DE NETTOYAGE ET DÉSINFECTION DE PILOTRAITE

Les parties identifiées comme sensibles telles que les faisceaux trayeurs sont démontées et nettoyées manuellement. Pour cela, elles sont brossées avec un alcalin chloré puis trempées dans du désinfectant.

Malgré cette procédure de nettoyage et désinfection drastique, il n'a pas été possible d'éliminer complètement le biofilm dans l'intégralité du pilote. Il y a donc un biofilm résident au sein de la machine à traire qui doit être caractérisé à chaque essai pour être pris en compte dans les résultats.

EN SAVOIR PLUS

LES BIOFILMS, HABITATS DES MICRO-ORGANISMES DANS LA MACHINE À TRAIRE

Toute machine à traire est support de biofilms formés par les micro-organismes. Ces communautés microbiennes sont immobilisées sur une surface et souvent enfouies dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires (Carpentier et Cerf, 1993) et vontensemencer le lait cru lors de son passage pendant la traite.

Elles donneront alors au lait ses caractéristiques et son aptitude à la transformation. L'élevage laitier doit fournir un lait sain, exempt de microorganismes pathogènes et de contaminants chimiques.

La filière lait cru doit être encore plus exigeante sur la qualité microbiologique du lait : l'objectif est à la fois de préserver les microflores d'intérêt pour la transformation fromagère et l'affinage, de limiter la présence de flores d'altération et de ne pas contenir de microflores potentiellement pathogènes. La maîtrise de la qualité microbiologique du lait est donc essentielle.

ETAPE 2 : TEST DE 2 MÉTHODES D'IMPLANTATION D'UN BIOFILM DANS LE PILOTE

Pour implanter un biofilm de terrain (dit complexe), constitué de micro-organismes pouvant être retrouvés dans une machine à traire en ferme, deux méthodes ont été testées. Au préalable, un test préliminaire d'implantation de biofilm simple dans le pilote a été effectué en faisant circuler du lait UHT enrichi en lactocoques (souche *Lactococcus lactis* EIP031).

- La première méthode testée : passage de lait UHTensemencé en ferme. Cette méthode d'implantation de biofilm complexe consiste à faire passer du lait UHT dans la machine à traire d'une exploitation laitière pour l'ensemencer puis à faire circuler ce lait dans le pilote en réalisant 2 passages de 2 heures par jour pendant 1 ou 2 jours. Ce rythme permet de simuler une journée de traite.
- La seconde méthode testée : remplacement d'un tronçon de lactoduc. Elle consiste à remplacer un tronçon du lactoduc de PiloTraite par un autre d'une machine à traire en ferme. Comme pour la première méthode, du lait UHT est ensuite mis en circulation dans le pilote 2 fois par jour pendant 2 heures sur 2 jours. Les microflores présentes dans le tronçon de lactoduc implanté vont ainsi se disséminer etensemencer le reste du pilote.

ETAPE 3 : MÉTHODE DE CARACTÉRISATION DU BIOFILM IMPLANTÉ

Pour caractériser le biofilm implanté, deux méthodes sont utilisées conjointement. La première permet d'apprécier le biofilm dans l'ensemble du pilote, mobilisable lors du passage du lait pendant la traite. Il s'agit de faire passer du lait UHT dans la MAT et d'analyser les grands groupes microbiens présents dans un échantillon (méthode FlorAcQ). La flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR), les bactéries Gram -, les levures et moisissures, la flore lactique et les flores d'affinage sont ainsi dénombrées. Une analyse métagénomique est également réalisée sur cet échantillon et permet d'identifier les genres bactériens présents dans le pilote.

La seconde méthode consiste à réaliser différents prélèvements par écouvillonnage sur 5 zones du pilote dites sensibles, comme le couvercle de la chambre de réception ou la vanne de la mamelle artificielle afin d'en apprécier le niveau de contamination.

PARTIE 2 : RÉSULTATS DES ESSAIS D'IMPLANTATION DES BIOFILMS

Les premiers essais d'implantation de biofilm dans le pilote ont consisté à planter un biofilm simple, composé de lactocoques. Le niveau de lactocoques alors retrouvé dans l'outil était proche du substrat de départ (soit 6 log UFC/ml), validant ainsi l'implantation du biofilm dans le pilote. Les résultats des essais d'implantation de biofilm complexe par circulation de lait ensemençé pendant 1 ou 2 jours (1J ou 2J), ainsi que par mise en place du tronçon de lactoduc de la ferme expérimentale caprine du Pradel, sont visibles sur la figure 2. Le biofilm résident (BR) du pilote a été caractérisé 3 fois au cours des essais (sans procédure d'implantation préalable). Au départ (BR1), celui-ci est composé de flore lactique (38%), de bactéries Gram - (34%,

essentiellement des *Pseudomonas* spp) et de levures et moisissures (28%), pour un niveau en flore totale de 2,7 log UFC/ml. Lors de la deuxième caractérisation (BR2), des flores d'affinage se sont implantées, tandis que les levures et moisissures n'ont pas été retrouvées. Ces flores d'affinage proviennent du lait UHT mis en circulation dans la MAT de l'exploitation voisine. Le niveau de contamination global a augmenté et atteint 4,5 log UFC/ml. Enfin, les 4 groupes microbiens sont présents dans la dernière analyse du biofilm résident (BR3), dont le niveau de contamination est de 4,1 log UFC/ml. Par conséquent, il contient à la fois des microflore d'intérêt et des microflore d'altération et est assez représentatif de la diversité de microflore

observable en fermes. Ainsi, l'apport de biofilm de terrain par du lait ensemençé a permis l'implantation de flore d'affinage dans le pilote. De plus, la quantité de microflore mobilisable dans ce dernier a augmenté au cours des essais d'implantation. Une circulation du lait pendant deux jours semble mieux favoriser l'implantation des biofilms, de même que l'utilisation d'un tronçon de lactoduc, les niveaux de microflore étant plus importants avec ces modalités qu'avec une circulation du lait sur 1 jour. Les microflore potentiellement pathogènes n'ont jamais été détectées dans le pilote.

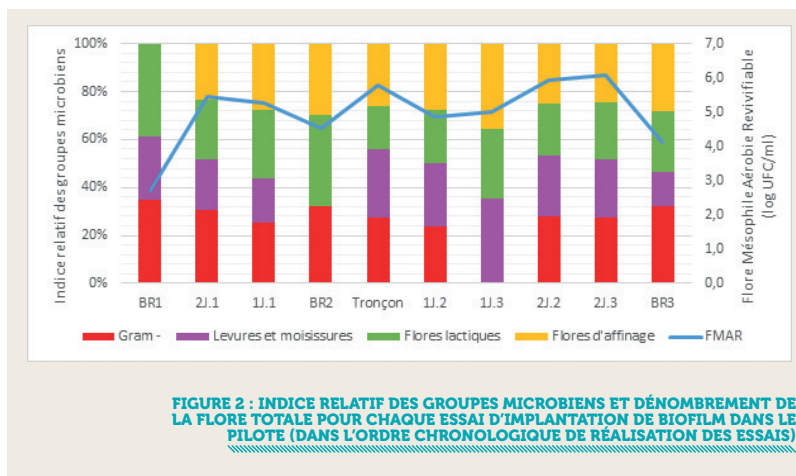


FIGURE 2 : INDICE RELATIF DES GROUPES MICROBIENS ET DÉNOMBREMENT DE LA FLORE TOTALE POUR CHAQUE ESSAI D'IMPLANTATION DE BIOFILM DANS LE PILOTE (DANS L'ORDRE CHRONOLOGIQUE DE RÉALISATION DES ESSAIS)

Les zones du pilote jugées sensibles ne sont pas exemptes de micro-organismes. La flore mésophile aérobie revivable (FMAR) a été dénombrée et indique que le niveau de contamination varie au cours du temps et selon la zone, allant de 1,5 à 7,4 log UFC/ml. Une microflore s'est également installée sur les coupons, elle est un peu plus importante pour la modalité 2 jours d'implantation. Il s'agit majoritairement de microflore d'altération, bien que les microflore d'intérêt soient plus développées avec des implantations sur 2 jours.

Il existe des méthodes de biologie moléculaire permettant d'identifier précisément chaque espèce bactérienne présente dans un échantillon tel que le métabarcoding. Après avoir extrait l'ADN des micro-organismes, le gène codant pour l'ARNr 16S est amplifié et séquencé. L'espèce bactérienne peut alors être déterminée par comparaison aux génomes de référence.

Des analyses par métabarcoding ont donc été conduites pour caractériser

précisément le biofilm résident du pilote et déterminer l'effet des différents protocoles d'implantation sur la modification de ce dernier. Ainsi, lors de la caractérisation du biofilm résident après nettoyage et désinfection de la machine à traire (NED1 et NED3), le biofilm global du pilote a été analysé. Pour chaque essai d'implantation, deux analyses par métabarcoding ont été effectuées sur le substrat de départ (lait ou lactoduc), le biofilm global du pilote et le biofilm des coupons en fin de procédure. L'abondance relative des 15 principaux genres bactériens au cours des essais d'implantation de biofilm dans le pilote est présentée sur la figure 3.

Entre le début et la fin des essais, le biofilm résident s'est enrichi et diversifié (NED1 et NED3). Les différentes procédures d'implantation de biofilm ont donc modifié la composition du biofilm résident du pilote. Globalement, les germes retrouvés sont représentatifs des contaminants naturels du lait, de l'eau ou de l'environnement.

EN PRATIQUE

Ces résultats ont permis de déterminer que, pour les futurs essais sur PiloTraite, l'implantation de biofilm se fera toujours sur deux jours afin de favoriser l'implantation d'un écosystème microbien complexe dans le pilote et sur les coupons.

Dans les substrats de départ (lait issu d'une ferme voisine ou lactoduc prélevé sur l'installation du Pradel), les genres bactériens majoritairement présents sont Streptococcus, Acinetobacter, Pseudomonas et Kocuria. Le biofilm résident du pilote est formé majoritairement de bactéries appartenant aux genres Lactococcus, Kurthia, Streptococcus, Anoxybacillus

et Acinetobacter. La mise en place de protocoles d'implantation de biofilms dans la MAT permet de modifier significativement la composition du microbiote. Le niveau de prédominance des streptocoques et d'Acinetobacter par rapport aux autres genres en présence, ainsi que la présence ou non en abondance de lactocoques, Pseudomonas, Kurthia, Thermus, et

Anoxybacillus, sont les principaux facteurs impactés par les procédures. L'analyse métagénomique permet de mettre en évidence la présence importante de genres microbiens habituellement non recherchés en microbiologie culturale, mais pour lesquels il serait intéressant de mieux connaître leur rôle au niveau du lait et des transformations laitières et fromagères.

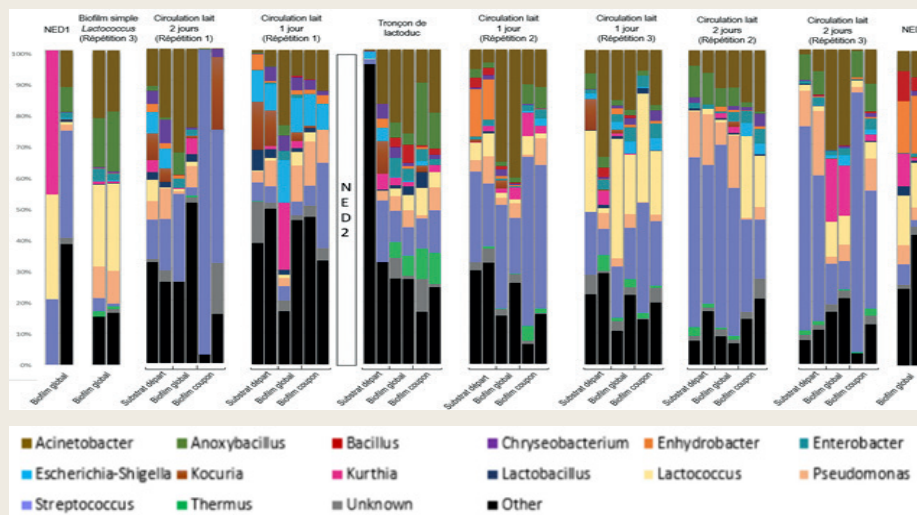


FIGURE 3 : INDICE RELATIF DES GROUPES MICROBIENS ET DÉNOMBREMENT : ABONDANCE RELATIVE DES 15 PRINCIPAUX GENRES BACTÉRIENS EN FONCTION DES ESSAIS D'IMPLANTATION DE BIOFILM DANS LE PILOTE (CLASSES PAR ORDRE CHRONOLOGIQUE)

EN SAVOIR PLUS

• SUR PILOTRAITE

Les procédures d'implantation et de destruction de biofilm dans le pilote étant désormais maîtrisées, l'une des prochaines expérimentations pourra être axée sur le nettoyage. Il s'agit d'une thématique englobant différentes questions, telles que l'influence des paramètres de nettoyage (température, concentration, etc.), l'efficacité de nouveaux produits de nettoyage ou encore les résidus de produits biocides pouvant être retrouvés dans le lait. Souvent cité dans les besoins des acteurs de la filière laitière, la lipolyse est également un sujet important qui pourra être investigué grâce à PiloTraite.

• SUR LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DU LAIT ET NOTAMMENT LES BIOFILMS

<https://idele.fr/detail-article/video-la-qualite-microbiologique-du-lait> (animation Genially)

Et <https://idele.fr/detail-article/infographie-la-qualite-microbiologique-du-lait>

• SUR LES PRESTATIONS « PILOTRAITE » PROPOSÉES À DERVAL

Pilotraite est un outil de recherche unique au monde auquel vous pouvez avoir accès. Que ce soit pour l'étude de biofilm dans la machine à traire, les procédures de nettoyage et désinfection ou encore la lipolyse, Pilotraite peut vous aider dans vos recherches.

• SUR LA PLATEFORME TRET

Pilotraite est situé sur la ferme expérimentale de Derval (44) et intègre la plateforme TRET (Transfert Recherche et Expertise autour de la Traite). Cette dernière est composée d'un robot de traite, une salle de traite expérimentale et d'un laboratoire TeCal (Traite et Compteurs à lait). Celui-ci est l'un des 3 laboratoires mondiaux agréés par ICAR comme centre de test. Les différents dispositifs permettent de tester des procédures de nettoyage, de mener des expérimentations sur la qualité du lait et les performances des matériels de traite.

<https://idele.fr/detail-article/la-plateforme-tret>

Pour plus d'informations : xavier.bourrigan@idele.fr

Responsables de la rédaction

Chloé Desmousseaux et Cécile Laithier

Référence bibliographique

Carpentier, B. and Cerf, O. (1993) Biofilms and Their Consequences, with Particular Reference to Hygiene in the Food Industry. Journal of Applied Bacteriology, 75, 499-511. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x>

Auteurs ayant contribué : Alice HUBERT, Jean-Louis POULET, Valérie HARDIT, Claire BOYER (Institut de l'élevage), Morgan GUILBAUD, Jean-Marie HERRY (AgroParisTech-INRAE), Violaine SALAÜN (Chambre d'Agriculture des Pyrénées Atlantiques), Régis PERION, Romain CHERON, Aurore MORAZIN (Kersia), Jean-Marie DUCRET, ERIC NOTZ (Centre Technique des Fromages Comtois), Valérie MICHEL, Aurélie HANIN, Nicolas ROSSI, Sawsen DEHAINE (Actalia), Gwenaëlle JARD, Hélène TORMO (Ecole d'ingénieurs de Purpan), Olivier PALARDY (Chambre d'Agriculture des Pays de la Loire), Guillemette ALLUT (Chambre d'Agriculture de Bourgogne-Franche-Comté), Nadia OULAHAL (Biodymia), Mickaël BERTON (Lemma), Pierre ULRICH (Ferme expérimentale caprine du Pradel)

Réalisation : beta pictoris • Mise en page : Institut de l'Élevage • Crédits photos : IDELE

Réf : 0024315020 • Octobre 2024