Conception et mise au point d'une machine à traire pilote (PiloTraite) pour étudier les biofilms et l'impact sur la qualité microbiologique du lait cru

Design and development of a pilot milking machine (PiloTraite) to study biofilms and the impact on the microbiological quality of raw milk

LAITHIER C. (1), DESMOUSSEAUX C. (1), HUBERT A. (1), POULET J-L. (1), ROSSI N. (2), ZOUAGHI S. (2), MICHEL V. (2), HANIN A. (2), GUILBAUD M. (3), HERRY J-M. (3), JARD G. (4), TORMO H. (4), OULAHAL N. (5), PERION R. (6), MORAZIN A. (6)
(1) Institut de l'Elevage, 149 Rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12, France
(2) Actalia, 310 Rue du Père Popielujko, 50000 Saint-Lô, France
(3) Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, 91120, Palaiseau, France
(4) Ecole d'Ingénieurs de Purpan, 75 Voie du Toec, 31076 Toulouse, France
(5) BioDyMIA, Université Claude Bernard Lyon 1 155 rue Henri de Boissieu, 01000 Bourg en Bresse, France
(6) Kersia, 55 Boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France

INTRODUCTION

Les biofilms présents sur les surfaces internes des machines à traire (MAT) constituent des réservoirs de microorganismes qui participent à l'ensemencement du lait cru à chaque traite. L'outil PiloTraite, MAT pilote, a été mis au point pour travailler en conditions les plus proches de la réalité tout en étant les plus contrôlées possibles. Afin de pouvoir étudier la problématique des biofilms, un dispositif spécifique support de coupons a été intégré dans l'outil. Des essais d'implantation de biofilm de terrain dans cet outil ont été réalisés et sont présentés dans cet article.

1. MATERIEL ET METHODES

Avant chaque essai, un nettoyage et désinfection (NED) renforcé du pilote MAT est réalisé afin d'éliminer au mieux les biofilms existants. La microflore mobilisable dans la MAT est prélevée par mise en circulation de lait UHT dans le circuit de lait, pour connaître l'état des biofilms avant expérimentation (**biofilm résident**).
Pour obtenir des biofilms de terrain, dits complexes, du lait UHT est mis en circulation dans la MAT d'une ferme voisine. Ce lait ensemencé avec des biofilms du terrain constitue le substrat de départ. Ce dernier est ensuite passé dans le pilote selon 2 modalités : 1 ou 2 jours, avec 2 passages de 2 h par jour simulant ainsi une ou deux journées de traite, sans procédure de NED entre chaque passage, seulement un rinçage. Chacune des 2 modalités est répétée 3 fois. Le biofilm résident est évalué au début, pendant et à la fin des essais d'implantations. Une autre méthode d'implantation de biofilm a été testée en remplaçant un tronçon de lactoduc par celui d'une autre MAT en fonctionnement sur la ferme expérimentale du Pradel.
Le biofilm implanté est évalué par écouvillonnage des coupons et analyse de lait UHT mis en circulation dans le pilote. La caractérisation des microflores est réalisée en utilisant les milieux de culture gélosés préconisés dans la démarche FlorAcQ (RMT Fromages de Terroirs, 2011) : flore aérobie mésophile totale, bactéries d'affinage, bactéries lactiques mésophiles, levures et moisissures, bactéries à Gram négatif et *Pseudomonas* spp. La présence de pathogènes (*Escherichia coli*, Staphylocoque à coagulase positive et *Listeria monocytogenes*) a également été recherchée. La composition des biofilms est également étudiée par analyse métabarcoding (16 s, bactéries ; ITS, levures/moisissures)

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Malgré la procédure de NED renforcée mise en place avant chaque essai, il n'a pas été possible d'éliminer complètement le biofilm présent dans le pilote, il y a donc existence d'un **biofilm résident** (BR) au sein de la MAT, constitué de microflores d'intérêt et d'altération. Les essais d'implantation de biofilm de terrain ont permis l'apparition de flores d'affinage dans le biofilm du pilote. Ce dernier s'est également enrichi au fil des essais, puisque la quantité de microflore mobilisable a augmenté de 1,4 log UFC/ml entre le début et la fin des expérimentations (figure 1).
Les procédures d'implantation sur 2 jours et l'utilisation d'un tronçon de lactoduc semblent favoriser le développement du biofilm dans le pilote, par rapport à celles sur 1 jour (respectivement 5,8 log UFC/ml contre 5,1 log UFC/ml).
Sur les coupons, une microflore d'altération s'implante en priorité. Aucune bactérie potentiellement pathogène n'a été détectée dans le pilote au cours des essais.

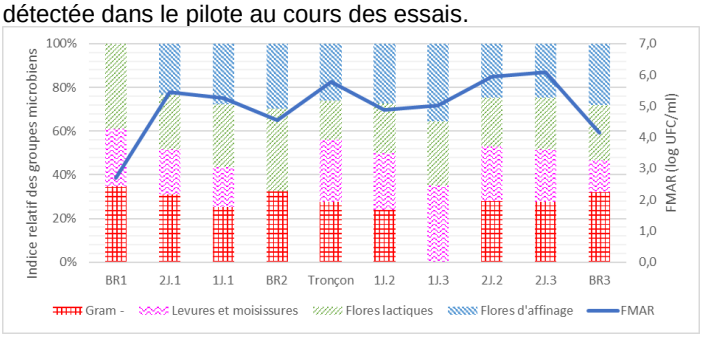

Figure 1 : Caractérisation et dénombrement des microflores implantées dans le pilote lors des essais successifs
BR : biofilm résident ; 1J ou 2J (1 ou 2 jours d'implantation)

L'analyse par métabarcoding a permis d'identifier précisément les genres bactériens majoritaires présents dans les différents échantillons. Ainsi, le substrat de départ était constitué de *Streptococcus* (24 %), *Acinetobacter* (11 %) et *Pseudomonas* (8 %). Ces bactéries sont majoritairement retrouvées dans le biofilm implanté dans le pilote et sur les coupons avec *Acinetobacter* (21%), *Streptococcus* (15%), *Pseudomonas* (6%) mais aussi *Lactococcus* (11%) et *Anoxybacillus* (5%). Après le NED, les genres bactériens *Lactococcus*, *Kurthia*, *Streptococcus*, *Anoxybacillus* et *Acinetobacter* composent majoritairement le biofilm résident de PiloTraite. Cette approche métagénétique a confirmé que la mise en place des protocoles d'implantation de biofilm dans le pilote modifie significativement la composition du microbiote de la MAT.

CONCLUSION

Un biofilm résident est établi dans le pilote et ne peut être complétement éliminé avant chaque essai malgré un protocole de NED drastique. Ce biofilm a pu être influencé par l'apport majeur de certaines microflores de la MAT issues d'une ferme voisine. Sa composition est assez représentative de la diversité de microflores retrouvée en ferme dans les MAT. Ce biofilm devra être caractérisé avant chaque essai sur PiloTraite, afin d'en tenir compte dans les résultats.
L'analyse par métabarcoding a permis d'approcher finement la diversité de microflores rencontrée dans une machine à traire.

RMT Fromages de Terroirs. 2011. Microflore du lait cru. Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation. Edition CNAOL - Paris. 129 p