



**HAL**  
open science

## Mise au point d'une MAT (Machine à traire) pilote pour étudier l'impact de la MAT sur la qualité du lait (Pilotraite)

Cécile Laithier, Alice Hubert, Jean-Louis Poulet, Chloé Desmousseaux, Valérie Hardit, Claire Boyer, Morgan Guilbaud, Jean-Marie Herry, Violaine Salaün, Régis Perion, et al.

### ► To cite this version:

Cécile Laithier, Alice Hubert, Jean-Louis Poulet, Chloé Desmousseaux, Valérie Hardit, et al.. Mise au point d'une MAT (Machine à traire) pilote pour étudier l'impact de la MAT sur la qualité du lait (Pilotraite). *Innovations Agronomiques*, 2024, 94, pp.83-98. 10.17180/ciag-2024-vol94-art06 . hal-04601019

**HAL Id: hal-04601019**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04601019>**

Submitted on 4 Jun 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



## Mise au point d'une MAT (Machine à traire) pilote pour étudier l'impact de la MAT sur la qualité du lait (Pilotraite)

Cécile LAITHIER<sup>1</sup>, Alice HUBERT<sup>1</sup>, Jean-Louis POULET<sup>1</sup>, Chloé DESMOUSSEAU<sup>1</sup>, Valérie HARDIT<sup>1</sup>, Claire BOYER<sup>1</sup>, Morgan GUILBAUD<sup>2</sup>, Jean-Marie HERRY<sup>2</sup>, Violaine SALAÜN<sup>3</sup>, Régis PERION<sup>4</sup>, Romain CHERON<sup>4</sup>, Aurore MORAZIN<sup>4</sup>, Jean-Marie DUCRET<sup>5</sup>, ERIC NOTZ<sup>5</sup>, Valérie MICHEL<sup>6</sup>, Aurélie HANIN<sup>6</sup>, Nicolas ROSSI<sup>6</sup>, Sawsen DEHAINE<sup>6</sup>, Gwenaëlle JARD<sup>7</sup>, Hélène TORMO<sup>7</sup>, Olivier PALARDY<sup>8</sup>, Guillemette ALLUT<sup>9</sup>, Nadia OULAHAL<sup>10</sup>, Mickaël BERTON<sup>11</sup>, Pierre ULRICH<sup>12</sup>.

<sup>1</sup> Institut de l'Elevage, 149 Rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12, France

<sup>2</sup> AgroParisTech-INRAE, 22 place de l'Agronomie, 91120 Palaiseau, France

<sup>3</sup> Chambre d'Agriculture des Pyrénées Atlantiques, 124 Boulevard Tourasse 64000 Pau, France

<sup>4</sup> Kersia, 55 Boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France

<sup>5</sup> Centre Technique des Fromages Comtois, 9 Avenue Wladimir Gagneur, 39800 Poligny, France

<sup>6</sup> Actalia, 310 rue du Père Popielujko, 50000 Saint-Lô, France

<sup>7</sup> Ecole d'Ingénieurs de Purpan, 75 Voie du Toec, 31076 Toulouse, France

<sup>8</sup> Chambre d'agriculture des Pays-de-la-Loire, 15 La Touche, 44590 Derval, France

<sup>9</sup> Chambre d'agriculture de Bourgogne-Franche-Comté, 1 Rue des Coulots, 21110 Bretenière, France

<sup>10</sup> Biodymia, 155 rue Henri de Boissieu, 01000 Bourg en Bresse, France

<sup>11</sup> Lemma 4 rue Blaise Desgoffe, 75006 Paris, France

<sup>12</sup> Ferme expérimentale caprine du Pradel, Domaine Olivier de Serres, 07170 Mirabel, France

**Correspondance** : cecile.laithier@idele.fr

### Résumé

La filière laitière est composée de nombreux acteurs ayant tous comme préoccupation commune la qualité du lait, avec des objectifs pouvant être spécifiques selon le contexte et la destination du lait. Celle-ci est multifactorielle et résulte de nombreux paramètres. L'une des principales composantes est la qualité microbiologique qui est déterminante pour l'aptitude technologique, la qualité sanitaire mais aussi la qualité organoleptique des fromages en filière lait cru. Elle est notamment liée à la machine à traire et plus précisément la conception, l'entretien et le nettoyage et désinfection de cette dernière. Des biofilms s'y installent et peuvent contaminer et/ou ensemercer le lait lors de son passage. Des études ont été effectuées sur le sujet, soit en laboratoires avec des conditions trop éloignées de la réalité, soit directement en exploitations avec des conditions d'essai de fait peu contrôlées. Pour répondre à cette problématique, l'Institut de l'Elevage et ses partenaires ont mis au point une machine à traire pilote, appelée PiloTraite, outil ne présentant pas d'équivalent au niveau international. Les attentes et besoins des divers acteurs de la filière laitière ont été entendus et pris en compte pour concevoir un outil permettant d'étudier, en conditions contrôlées, l'impact de la machine à traire (conception, entretien, nettoyage/désinfection) sur la qualité du lait, et notamment la question des biofilms en lien avec la qualité microbiologique du lait. Cet article présente la méthodologie suivie pour la construction de Pilotraite et les essais effectués pour définir les modalités de prélèvement, d'implantation et de destruction des biofilms dans le pilote.

**Mots-clés** : Qualité du lait, machine à traire, biofilm, nettoyage, outil pilote



## **Abstract: Designing a pilot milking machine for analysing the effect of the milking machine on milk quality**

The dairy sector is made up of many players all having the quality of milk as a common concern, with objectives that may be specific depending on the context and the destination of the milk. This is multifactorial and results from numerous parameters. One of the main components is the microbiological quality, which is determining for the technological suitability, the health quality but also the organoleptic quality of cheeses in the raw milk sector. It is particularly linked to the milking machine and more precisely the design, maintenance and cleaning and disinfection of the latter. Biofilms settle there and can contaminate and/or seed the milk as it passes through. Studies have been carried out on the subject, either in laboratories with conditions too far removed from reality, or directly on farms with poorly controlled test conditions. To respond to this problem, the Livestock Institute and its partners have developed a pilot milking machine called Pilotraite, a tool with no equivalent at the international level. The expectations and needs of the various stakeholders in the dairy sector were analysed and considered to design a tool allowing the study, under controlled conditions, of the impact of the milking machine (design, maintenance, cleaning/disinfection) on the quality of milk, and in particular the question of biofilms linked to the microbiological quality of milk. This article presents the methodology followed for the construction of Pilotraite and the tests carried out to define the methods of sampling, implantation, and destruction of biofilms in the pilot.

**Keywords:** Milk quality, milking machine, biofilm, cleaning, pilot tool

## **1 Introduction**

La qualité du lait de vache est conditionnée par de nombreux paramètres de différentes natures (physique, chimique et microbiologique) dont dépendent la qualité sanitaire, technologique, organoleptique et nutritionnelle. 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 microflore d'intérêt pour la transformation fromagère et l'affinage, limiter la présence de flores d'altération et ne pas contenir de microflore potentiellement pathogènes. La maîtrise de la qualité microbiologique du lait est donc essentielle. Cette microflore du lait, en l'absence d'infection mammaire, provient principalement des trayons de l'animal, de l'air et de la MAT (Machine A Traire), eux-mêmesensemencés par d'autres sources comme le sol, l'alimentation, les litières, l'eau ou le trayeur. Le matériel de traite est un élément important à maîtriser car des biofilms peuvent s'installer au fil du temps sur les surfaces internes des tuyaux et canalisations (RMT Fromages de Terroirs, 2011). Il s'agit d'agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique, protégeant ainsi les bactéries et leur permettant notamment de résister aux biocides (antibiotiques et désinfectants) (Tremblay *et al.*, 2014). Le passage de liquide comme le lait dans la MAT entraîne le décrochage de certains micro-organismes qui contaminent et/ou ensemencent alors le fluide. La conception, l'entretien et le nettoyage et désinfection (NED) de la MAT sont autant de facteurs pouvant influencer l'implantation et le développement des biofilms (Marchand *et al.*, 2012). Les acteurs de la filière laitière sont demandeurs d'études sur le sujet afin de mieux maîtriser la qualité microbiologique du lait. Les recherches effectuées en laboratoire sont souvent trop éloignées du terrain pour être transposables, et à l'inverse, les conditions expérimentales sur le terrain sont difficilement maîtrisables (Laithier *et al.*, 2005). Pour répondre à cette problématique, l'Institut de l'Élevage, entouré de nombreux partenaires, a mené le projet PiloTraite, visant à construire une MAT pilote pour étudier l'impact, en conditions contrôlées, de la MAT avec ses facteurs de variation sur la qualité du lait. Elle doit notamment permettre d'étudier les biofilms des MAT (implantation, maîtrise, destruction) en lien avec la qualité microbiologique du lait. La création de cet outil devait permettre de répondre à différents objectifs :

- Reproduire les conditions de fonctionnement d'une MAT,



- Mesurer et enregistrer les paramètres de fonctionnement du pilote (débits, températures, etc.),
- Réaliser différents prélèvements de lait et de biofilm, pour évaluer leurs caractéristiques en termes de qualité,
- Être modulable, afin de simuler les différentes situations de traite (système, espèce laitière...).

Cet article présente la méthodologie ayant permis de mettre au point l'outil et les premiers résultats obtenus sur l'implantation et la destruction de biofilm dans la MAT pilote.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1. Mise au point d'une MAT pilote modulable et incluant un dispositif d'étude des biofilms

L'objectif de cette première partie était de construire une MAT pilote, correspondant aux attentes de l'ensemble des acteurs et fournisseurs de la filière laitière, afin de permettre la réalisation d'études sur les liens entre MAT et qualité du lait.

#### 2.1.1. *Formalisation des attentes et besoins des acteurs de la filière laitière*

Dans un premier temps, une enquête a été effectuée auprès des acteurs de la filière laitière pour identifier les éléments à inclure dans le cahier des charges du pilote et ainsi répondre à leurs attentes et besoins. Un point sur les connaissances disponibles sur la MAT a également été réalisé. L'enquête qualitative comportait les points suivants : profil de l'enquêté, ses intérêts pour la MAT et pour la qualité du lait, sa perception des liens entre MAT et qualité du lait (biofilms, nettoyage), ainsi qu'un échange sur l'outil PiloTraite, avec les perspectives de recherche associées.

#### 2.1.2. *Caractérisation des flux au sein de la future MAT pilote et rédaction du cahier des charges*

Le cahier des charges de réalisation de l'outil pilote devait prendre en compte les contraintes techniques et expérimentales, en lien avec les attentes identifiées lors de l'enquête. Ainsi, la caractérisation des flux d'air et de liquide (lait et solutions de NED) dans le futur pilote a permis de choisir le positionnement et la forme du dispositif d'étude des biofilms, en minimisant son impact sur les flux, et d'avoir une connaissance fine de ces derniers. Ce travail a été réalisé par Lemma (Laboratoire de mathématiques appliquées), qui a proposé une approche en 2 temps : obtenir des premiers résultats sur les régimes d'écoulement par le biais d'une approche semi-empirique grâce à des cartes d'écoulements diphasiques déjà établies, puis de réaliser des calculs plus précis via l'utilisation d'un outil permettant des modélisations dynamiques (Computational Fluid Dynamics).

L'analyse de la base de données Logimat, qui est le logiciel de saisie et de suivi des contrôles MAT géré par le COFIT (COmité Français Interprofessionnel pour les Techniques de production du lait), a également permis de compléter le cahier des charges du pilote pour que celui-ci soit représentatif d'une MAT médiane française, en filière bovine et en petits ruminants, rapporté à un dimensionnement compatible avec les contraintes du laboratoire. Ce cahier des charges a été envoyé aux principaux constructeurs de MAT (DeLaval, GEA FT, BouMatic, Fullwood et SAC Christensen) afin qu'ils puissent répondre à cet appel d'offre et a été affiné au fur et à mesure des échanges.

#### 2.1.3. *Construction de la MAT pilote intégrant un dispositif spécifique d'étude des biofilms*

Afin d'étudier plus spécifiquement les biofilms, un dispositif porte-coupons est intégré au pilote. Celui conçu par le CETIM (CEntre Technique des Industries Mécaniques) et utilisé par l'Institut Technique du Vin a été choisi pour construire le dispositif de PiloTraite (ACTALIA et al., 2016). Cependant, quelques points de vigilance ont été relevés, en fonction notamment des résultats de caractérisation des flux, et pris en compte pour la conception :



- Modification de la forme intérieure pour permettre une correction progressive du flux en entrée et en sortie du dispositif, en raison d'une différence de profil (cylindrique puis rectangulaire et de nouveau cylindrique) et de l'aspect diphasique de l'écoulement,
- Positionnement des coupons de façon à éviter un affleurement positif pouvant faciliter l'encrassement.

La caractérisation des surfaces avait pour objectif de déterminer l'impact des méthodes de prélèvement sur des coupons d'acier inoxydable, ainsi que celui des conditions d'utilisation du pilote sur les coupons et la veine porte-coupons. Pour cela, des mesures de mouillabilité et de rugosité des surfaces ont été réalisées par AgroParisTech. La rugosité des coupons d'acier inoxydable fournis a été mesurée selon 3 axes différents à l'aide d'un rugosimètre MITUTOYO SJ210, tandis que la mouillabilité de surface des coupons a été évaluée à l'aide d'un macrogoniometre DSA100 (Kruss), par la « méthode de la goutte posée ».

## **2.2. Définition des conditions d'utilisation du pilote pour étudier les biofilms**

Une fois le pilote construit, la deuxième partie du projet consistait à définir les conditions d'utilisation de ce dernier pour étudier les biofilms. Cela comprenait la méthode de prélèvement, les modalités d'implantation et le protocole de destruction des biofilms. Ainsi, les conditions d'étude standardisées permettent d'obtenir des résultats fiables et répétables.

### *2.2.1. Détermination de la méthode de prélèvements des biofilms*

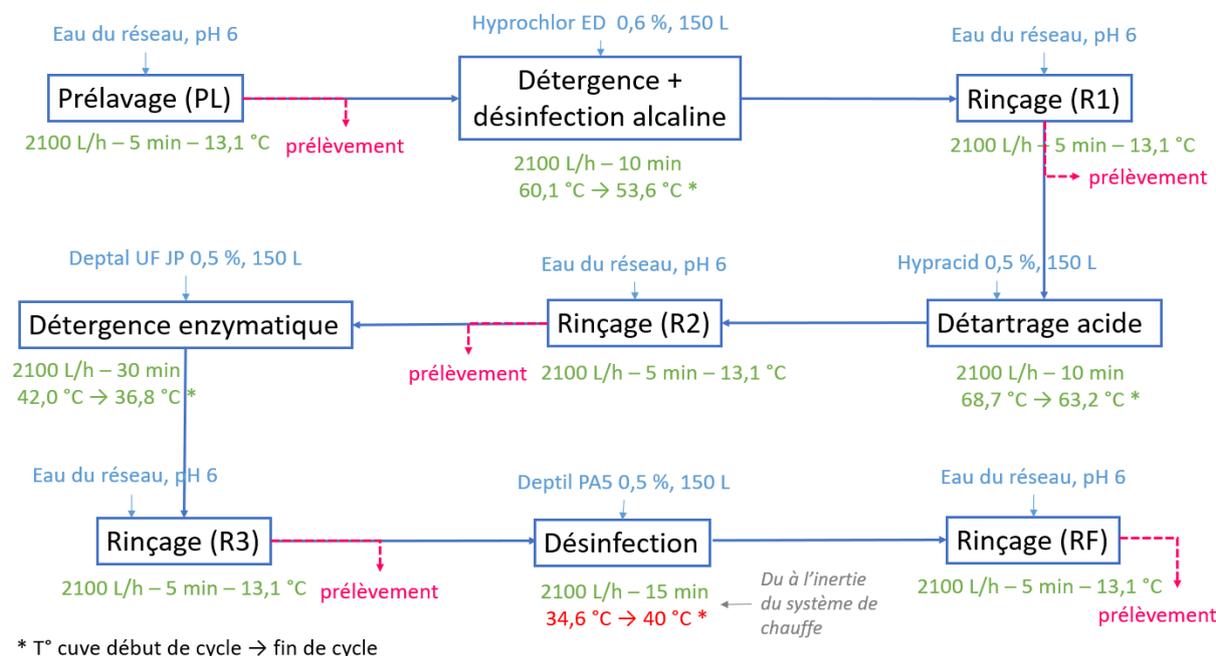
Afin de déterminer la méthode de prélèvement des biofilms à utiliser dans la MAT pilote, les travaux du RMT Chlean ont servi de références (Brauge *et al.*, 2020). Ainsi, deux modalités ont été testées : utilisation d'une spatule ou d'un écouvillon sur un biofilm de *Pseudomonas* ou un biofilm de *Pseudomonas* / Lactocoques sur inox ou caoutchouc. Pour chacune des deux séries effectuées, 6 coupons étaient testés par modalité.

Les coupons, disposés dans des boîtes de Petri, ont été inoculés avec 15 ml de préparation de souches microbiennes en milieu MMBB (Milk Modified Biofilm Broth) et lait UHT (Ultra Haute Température) à 0,1 %, à une concentration de  $10^6$  UFC/ml, pendant 18 h à température ambiante. Les coupons étaient ensuite rincés deux fois à l'EPT (Eau Peptonée Tamponnée, Biokar), à volume équivalent, et placés dans de nouvelles boîtes. Les coupons étaient alors laissés en « phase sèche », à température ambiante, pendant 6 h (couvercle de la boîte de Pétri en place). Du milieu MMBB composé de  $MgSO_4$  (200 mg/L), de  $FeSO_4$  (0,5 mg/L), de  $Na_2HPO_4$  (1250 mg/L), de  $KH_2PO_4$  (500 mg/L), de  $(NH_4)_2SO_4$  (100 mg/L) avec 0,1 % de lait UHT stérile a ensuite été rajouté (15 mL), afin de renouveler le milieu, puis les coupons ont été à nouveau incubés à température ambiante, pendant 18 h. Ce même protocole a été répété sur un cycle de 72 h, avant prélèvement des biofilms et dénombrement des cellules planctoniques.

### *2.2.2. Définition des modalités de destruction des biofilms dans le pilote*

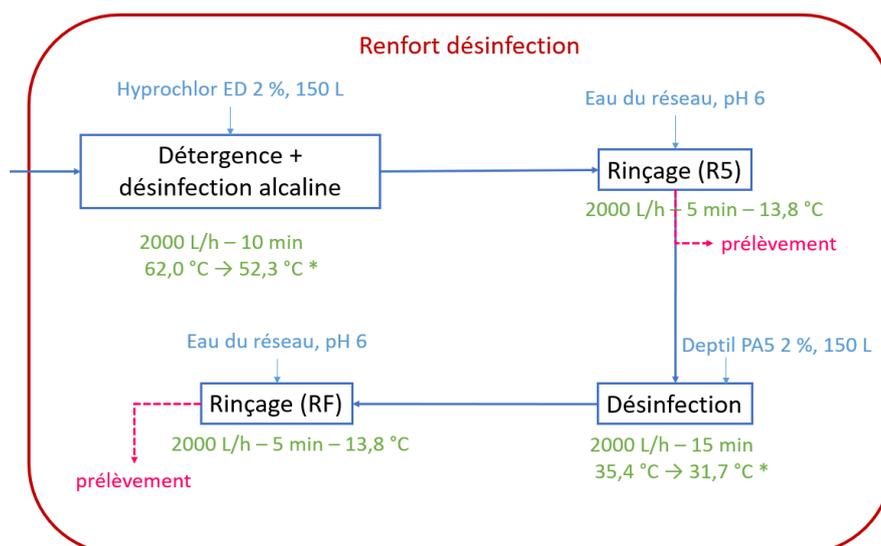
Les premiers essais de nettoyage et désinfection ont été effectués en halle, chez Actalia, sur un dispositif composé d'un faisceau trayeur, d'un tuyau et d'un faisceau de lavage, qui sont des parties complexes difficiles à nettoyer. Afin d'accroître l'adhésion de la souillure modèle sur le circuit test et de se rapprocher de conditions similaires à des encrassements réels, un séchage prolongé (3 jours) par circulation d'air comprimé a été réalisé afin de diminuer l'humidité cible en sortie de circuit (HR < 5 %). Le protocole de NED de niveau 3, préalablement validé avec Kersia, a été appliqué (figure 1). De la gélose MSHA (Modified Shapton and Hindes Agar, Document N°2 ©EHEDG), violette au départ, est ensuite coulée dans le matériel pour réaliser un moulage. Après incubation et démoulage, la présence résiduelle de souillures (spores de *Geobacillus*) est visualisable par un changement de couleur de la gélose en jaune. Cette méthode de détection est très sensible (jusqu'à 1 UFC/cm<sup>2</sup>). La gélose en contact avec la surface interne de l'équipement est ensuite détournée pour être convertie en *mapping* 2D. Un tube de référence

(tube droit) a subi le même traitement que le matériel testé, pour valider le bon déroulement du nettoyage en place (méthode similaire à la méthode reconnue internationalement du Document 2 de l'EHEDG (EHEDG Guidelines, 2023)).



**Figure 1** : Protocole de Nettoyage et Désinfection (NED) niveau 3

À la suite des résultats des premiers essais, un autre protocole de NED niveau 3+ (renforcé) a été proposé, pour lequel les concentrations de produits biocides (Hydrochlor ED et Deptil PA5) sont augmentées à 2 % et deux phases supplémentaires de renfort de désinfection sont ajoutées en fin de process (figure 2).



**Figure 2** : Renfort de désinfection appliqué au protocole de NED 3+

Les tests ont ensuite été effectués sur le dispositif porte-coupons, puis sur la MAT pilote. Pour évaluer son efficacité, des prélèvements sur les parties sensibles ont été réalisés avant et après nettoyage. Il s'agissait du couvercle de la chambre de réception, du tronçon souple du lactoduc d'évacuation après la pompe à lait, de la vanne de circulation pour le lavage, des tuyaux d'approvisionnement et des vannes

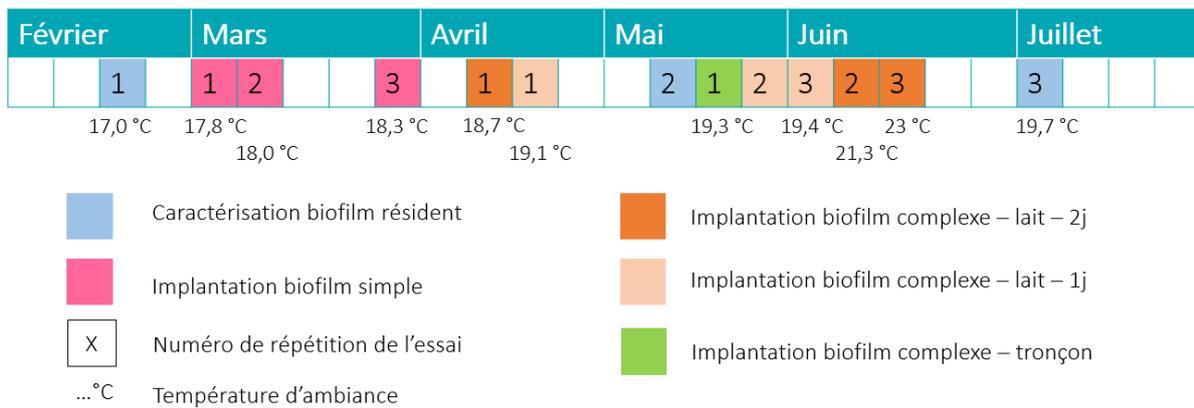


des mamelles artificielles. Du lait UHT a également été mis en circulation dans le pilote, après nettoyage, et recueilli à la sortie de la purge automatique pour analyser les flores bactériennes encore présentes.

### 2.2.3. Définition des modalités d'implantation de biofilms dans le pilote

L'objectif des essais suivants était d'implanter dans le pilote un biofilm de terrain, dit complexe, représentatif de ce qui est observé dans les MAT en ferme. Pour y parvenir, différents tests ont été conduits selon le calendrier présenté sur la figure 3.

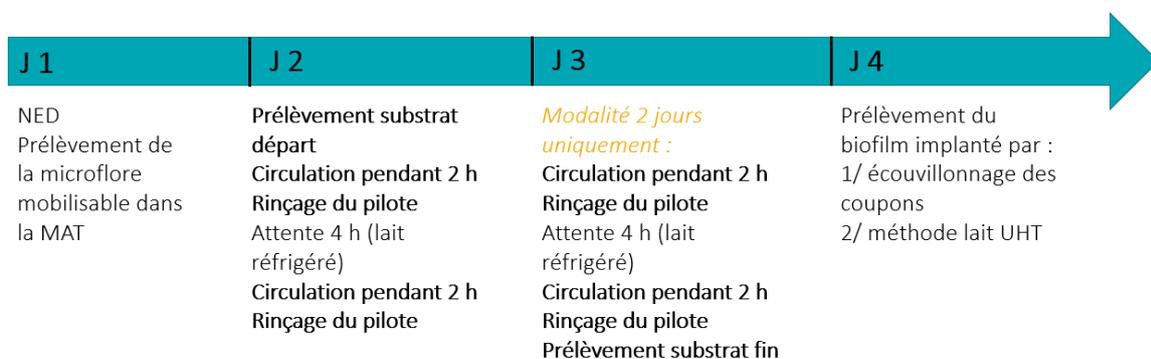
Avant chaque essai d'implantation, le pilote était nettoyé et désinfecté. Cependant, les prélèvements sur les zones sensibles et par circulation de lait UHT dans le pilote ont montré que la procédure de nettoyage ne suffit pas à éliminer complètement le biofilm présent dans la MAT. Ce biofilm résident (BR) a été caractérisé au début, au milieu et à la fin des essais d'implantation de biofilm.



**Figure 3** : Calendrier des essais d'implantation de biofilm dans le pilote (année 2021)

Des tests préalables d'implantation de biofilm ont été effectués à partir d'un biofilm simple, constitué uniquement de Lactocoques, par circulation de lait UHT enrichi en Lactocoques dans la MAT pilote. La souche retenue était *Lactococcus lactis* EIP031. Elle a été choisie pour ses caractéristiques moyennes au niveau de l'adhésion et de la capacité acidifiante.

La première méthode d'implantation de biofilms complexes consistait à ensemer du lait UHT avec des biofilms de terrain, obtenus en faisant circuler ce dernier dans la MAT d'une exploitation voisine (afin de travailler avec du lait frais). Ce lait était ensuite mis en circulation dans le pilote, pendant 1 ou 2 jours, avec deux passages par jour de 2 h, simulant ainsi une journée de traite. Un rinçage est effectué après chaque circulation de lait. Pendant les phases d'attente, le lait était réfrigéré. Le biofilm alors implanté était prélevé par écouvillonnage des coupons et par dénombrement de la microflore mobilisable dans le lait UHT ayant circulé dans le pilote (figure 4).



**Figure 4** : Protocole d'implantation de biofilm complexe par circulation de laitensemencé



La seconde méthode consistait à utiliser comme vecteur le tronçon amovible de lactoduc de la MAT de la ferme expérimentale du Pradel. De façon similaire à la première méthode, le pilote est d'abord nettoyé et désinfecté. La microflore mobilisable du tronçon est prélevée par écouvonnage sur une surface équivalente à celle d'un coupon. Le tronçon est installé ensuite sur le pilote, puis le même schéma de circulation de lait est appliqué pendant 2 jours. Le 4<sup>e</sup> jour, le biofilm est prélevé par écouvonnage des coupons et dans le lait UHT ayant circulé dans le pilote.

Les prélèvements suivants ont été réalisés pour pouvoir caractériser les biofilms présents dans le pilote lors des essais d'implantation :

- Sur les coupons : écouvonnage de la surface. Pour une conservation au congélateur, chaque écouvillon est placé dans 25 ml de lait UHT et 5 ml de glycérol. Pour une conservation au réfrigérateur, chaque écouvillon est placé dans 30 ml de lait UHT.
- Dans la globalité du pilote : passage de lait UHT dans le pilote (16 L), aspiration par les mamelles artificielles et récupération au lactoduc d'évacuation. Pour une conservation au congélateur, 40 ml de lait sont additionnés de 10 ml de glycérol pour constituer chaque échantillon. Pour une conservation au réfrigérateur, les échantillons sont constitués de 150 ml de lait uniquement.

#### 2.2.4. Caractérisation des microflores des biofilms

##### **Etude de la composition des biofilms par dénombrement microbien sur milieu sélectif**

La caractérisation des microflores a été réalisée en utilisant les milieux de culture gélosés préconisés dans la démarche FlorAcQ (RMT Fromages de Terroirs, 2011) : flore aérobie mésophile totale (PCA), bactéries d'affinage (CRBM), bactéries lactiques mésophiles (MRSi), levures et moisissures (OGA), bactéries à Gram négatif (PCAI), *Pseudomonas* spp (CFC). L'Indice Relatif des principaux groupes microbiens (proportion du niveau de chaque groupe microbien par rapport à la somme de niveaux des 5 groupes) a été calculé. Les microflores potentiellement pathogènes ont également été analysées (*Listeria monocytogenes*, staphylocoques à coagulase positive, *Escherichia coli*).

##### **Etude de la composition des biofilms par métabarcoding**

Pour chaque échantillon, l'extraction est effectuée en duplicat. Après décongélation des échantillons, 5 ml de lait sont dilués dans 45 ml d'eau citratée, puis centrifugés à 6 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé. Cette étape permet d'éliminer la matière grasse présente dans l'échantillon et pouvant gêner l'extraction de l'ADN bactérien. La matière grasse présente sur les parois est également éliminée à l'aide d'un écouvillon stérile. Les étapes précédentes sont répétées deux fois, pour un volume total d'échantillon de lait de 15 ml. Le culot est ensuite repris avec 2 ml d'eau citratée et est de nouveau centrifugé à 6 000 g pendant 15 min.

L'extraction est ensuite réalisée sur le culot à l'aide du kit Dneasy® Blood and Tissue (Qiagen, Courtabœuf, France). Une combinaison de digestion par lysozyme (20 mg/ml) et protéinase K (64 mAU/ml) a été utilisée pour la lyse. Entre chaque digestion, une étape de lyse mécanique est effectuée. Pour ce faire, environ 75 mg de microbilles de verre de 150 µm-212 µm (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) sont ajoutés. Deux broyages de 2 min sont effectués à l'aide d'un Digital Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc, New York, USA). Les échantillons sont remis sur glace entre chaque broyage. Afin d'éliminer les éventuels ARN présents, les échantillons sont traités à la RNase A à une concentration de 1 mg/ml (Promega, Charbonnières-les-bains, France). La quantité et la pureté de l'ADN ont été évaluées à l'aide du NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) et les échantillons ont été stockés à -20 °C. Après l'amplification par PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée dans le but de vérifier la présence d'ADN. Pour les bactéries, un amplicon d'une taille moyenne de 500 pb est attendu. La taille de l'amplicon est beaucoup plus variable pour les champignons.



Pour les cibles bactériennes, seul un échantillon sur les 48 n'a pas permis l'obtention d'une bande visible sur gel d'agarose. En revanche, les résultats sont plus contrastés pour les amplicons de champignons avec un amplicon visible sur gel pour 22 échantillons sur 48. Néanmoins, l'absence de bande sur gel n'étant pas obligatoirement synonyme d'absence d'amplification, l'ensemble des produits PCR ont été envoyés en séquençage après consultation pour avis de la personne en charge du séquençage.

### 3 Résultats et discussion

#### **3.1. Mise au point d'une MAT pilote modulable et incluant un dispositif d'étude des biofilms**

##### *3.1.1. Formalisation des attendus du pilote*

Durant l'étude, 36 entretiens semi-directifs ont été conduits. Des éleveurs, transformateurs, conseillers, constructeurs de MAT, fabricants de produits de NED des 3 filières laitières (bovin, ovin et caprin) ont été interrogés. Quatre sujets ont été fréquemment cités par les acteurs enquêtés :

- Connaissance et approfondissement de la notion de biofilms,
- Impact des procédures de nettoyage,
- Flux d'air et de lait dans la machine à traire,
- Lipolyse induite.

Globalement, le niveau de connaissances sur les biofilms et le nettoyage de la MAT est variable selon les acteurs. Ainsi, les éleveurs et installateurs souhaitent davantage de formation et sensibilisation au nettoyage, les techniciens et fabricants de produits de NED sont intéressés pour travailler sur les paramètres et les protocoles de nettoyage, tandis que les transformateurs voudraient des études sur les potentiels résidus dans le lait et les rejets dans l'environnement. Les attentes des acteurs ont été prises en compte dans le cahier des charges de la MAT pilote, celle-ci pourra donc répondre aux demandes des acteurs et aux problématiques des filières laitières dans les années à venir en étant un outil de recherche complet et un support pédagogique.

##### *3.1.2. Caractérisation des flux au sein de la MAT pilote et propriétés de surface des coupons*

En traite, le régime d'écoulement du lait dans le pilote est « stratifié à vagues », mais assez proche d'un écoulement laminaire recherché. En lavage, le régime est identique, peu de modifications de l'écoulement ont été constatées dans la configuration modélisée. De même, il n'y a pas de turbulences (passage de bouchons). Le lactoduc est rempli à 45 % pendant le lavage. Un nettoyage optimisé pourrait être obtenu avec un régime d'écoulement « annulaire », mais cela nécessite d'augmenter les forces de frottements en ayant un débit d'air supérieur à 1 200 L/min. Le dispositif porte-coupons ne modifie pas radicalement les écoulements de lait ou de solutions de lavage. Les vitesses locales, au niveau de chaque coupon, sont assez peu différentes. Cependant, le coupon le plus en amont se situe dans une zone où l'écoulement est encore perturbé par le changement de géométrie (cylindrique à cubique). Son nettoyage risque d'en être significativement affecté. La MAT pilote et son porte-coupons ont été conçus, modifiés et adaptés en fonction des résultats des modélisations de Lemma, très souvent confirmées par des mises en situations en parallèle ou *a posteriori*.

Les prélèvements effectués sur les coupons d'acier inoxydable n'ont pas d'impact sur la mouillabilité et la rugosité de ces derniers, quelle que soit la méthode utilisée (spatule ou écouvillon). En revanche, l'hydrophilie de surface augmente après utilisation, ce qui pourrait être liée à un encrassement macromoléculaire, dû à la présence antérieure du biofilm. Cela aura un impact sur l'implantation future des micro-organismes sur les coupons.

### 3.1.3. Construction du Pilotraite

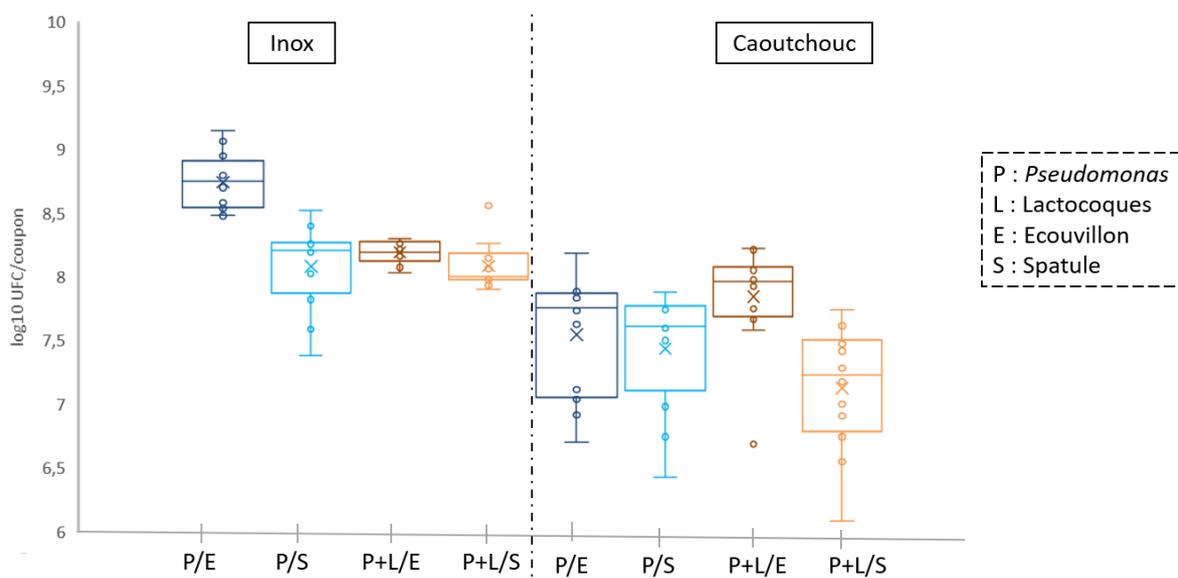
Pour la construction de la MAT pilote, la proposition de BouMatic a été retenue. Bien que l'outil soit modulable, il a été configuré dans un premier temps pour simuler la traite de bovins. Pour les aspects pédagogiques, il a été choisi d'installer une chambre de réception en verre et un viseur en verre sur le lactoduc. De même, pour les besoins expérimentaux, il est possible de doser manuellement les produits de NED et le pilote a été équipé d'un automate de lavage paramétrable. Un système de traitement d'eau, par peroxyde d'hydrogène ou chlore, a également été installé. Pour les simulations de traite, 4 mamelles artificielles ont été conçues et imprimées en grande partie en 3D.

Les débits de liquide circulant ont été réglés et homogénéisés à 4 L/min de débit moyen, pour respecter la norme ISO 6690. Pour des raisons budgétaires, le débit est continu et moyen. En traite, l'équivalent d'un Certi'Traite® a été effectué. Des anomalies ont été repérées et corrigées.

## 3.2. Définition des conditions d'utilisation du pilote pour étudier les biofilms

### 3.2.1. Prélèvements des biofilms

La figure 5 illustre les résultats obtenus pour les prélèvements de biofilm selon la méthode, le support et les bactéries formant le biofilm. Les bactéries se décrochent mieux sur inox que sur caoutchouc. La méthode avec écouvillon semble plus efficace pour décrocher les bactéries (bleu foncé et marron), les valeurs sont moins dispersées et plus importantes qu'avec la spatule. De plus, l'usage de l'écouvillon est plus pratique que la spatule et sera donc utilisé pour les prochains essais.



**Figure 5 :** Résultats de dénombrement microbien des prélèvements sur coupons selon les modalités spatule ou écouvillon

### 3.2.2. Destruction des biofilms dans le pilote

Les essais réalisés sur le circuit test ont permis de valider le protocole de NED niveau 3, ainsi que la bonne aptitude au nettoyage en place des parties en caoutchouc du circuit test. Cependant, des souillures persistent sur certains items du circuit test : sur les tuyaux d' « inlet » et d' « outlet », dans la griffe de lavage et dans une moindre mesure dans la griffe de traite. Le protocole de NED niveau 3+ n'a pas apporté de meilleurs résultats que le protocole de niveau 3. Par conséquent, les parties identifiées comme non nettoyables en place doivent être démontées et nettoyées manuellement pour les essais sur pilote.



Actalia a également effectué des essais sur le dispositif porte-coupons suivant le protocole de NED niveau 3, et ceux-ci n'ont montré aucune persistance de souillures. Une simplification du protocole de nettoyage a donc été testée (retrait de la dernière phase de désinfection), mais des souillures ont été constatées au niveau des joints, invalidant ce protocole. La procédure de niveau 3 a donc été retenue pour les essais sur le pilote.

Lors des essais sur le pilote, le détergent enzymatique a entraîné la formation d'une quantité importante de mousse, qui remontait dans le système de vide, ce qui est formellement déconseillé. Le protocole NED de niveau 3 a donc été modifié, en enlevant le cycle avec produit enzymatique et en remplaçant le premier acide par un acide désinfectant. Le protocole ainsi retenu est présenté sur la figure 6.

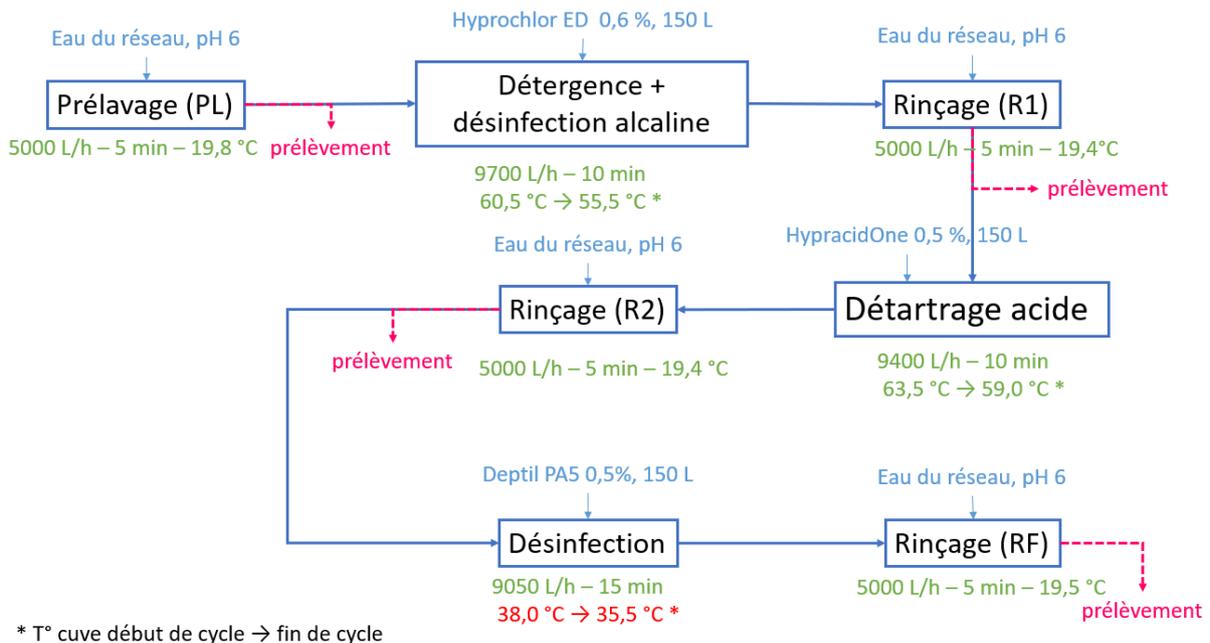


Figure 6 : Procédure de NED niveau 3 retenue

En complément, les parties sensibles du pilote ont été identifiées, lors d'un audit par Actalia. Il s'agit notamment des faisceaux trayeurs, qui doivent donc être démontées et nettoyées manuellement. Pour cela, deux procédures ont été testées : soit un brossage avec alcalin chloré puis trempage avec désinfectant ou bien un brossage avec alcalin chloré uniquement. La première a permis d'obtenir de meilleurs résultats et est retenue pour la réalisation des essais d'implantation de biofilm.

Malgré cette procédure de NED 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 MAT** qui doit être caractérisé à chaque essai pour être pris en compte dans les résultats. L'évolution de ce biofilm résident est décrite au paragraphe suivant.

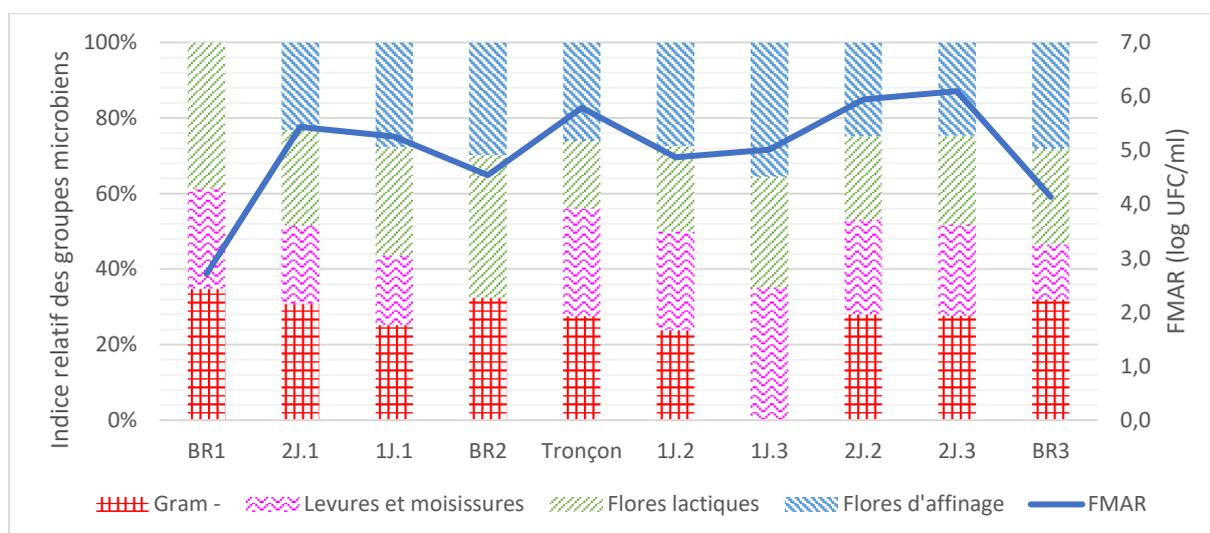
### 3.2.3. Implantation et évolution des biofilms dans le pilote

Les premiers essais d'implantation de biofilm dans le pilote ont consisté à implanter un biofilm simple, composé de lactocoques, dans le pilote. 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 laitensemencé pendant 1 ou 2 jours (1J ou 2J), ainsi que par mise en place du tronçon de lactoduc du Pradel, sont visibles sur la figure 7. Au départ, le biofilm résident du pilote (BR) 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, des flores d'affinage se

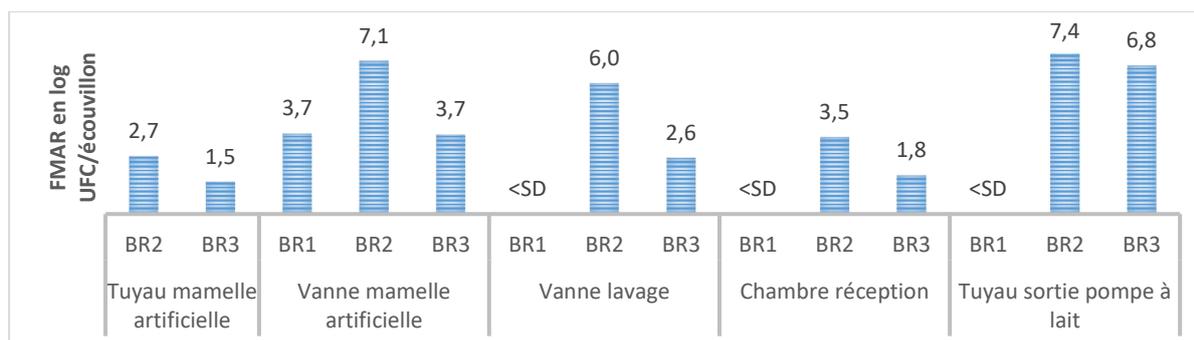


sont implantées, tandis que les levures et moisissures n'ont pas été retrouvées. Ces flores d'affinage proviennent du lait UHT mis en circulation dans la MAT de l'exploitation voisine. Le niveau de contamination global a augmenté et atteint 4,5 log UFC/ml. Enfin, les 4 groupes microbiens précédemment cités sont présents dans la dernière analyse du biofilm résident, 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 (Laithier and Dartailh, 2014). Ainsi, l'apport de biofilm de terrain par du lait ensemencé 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. Les microflore potentiellement pathogènes n'ont jamais été détectées dans le pilote.



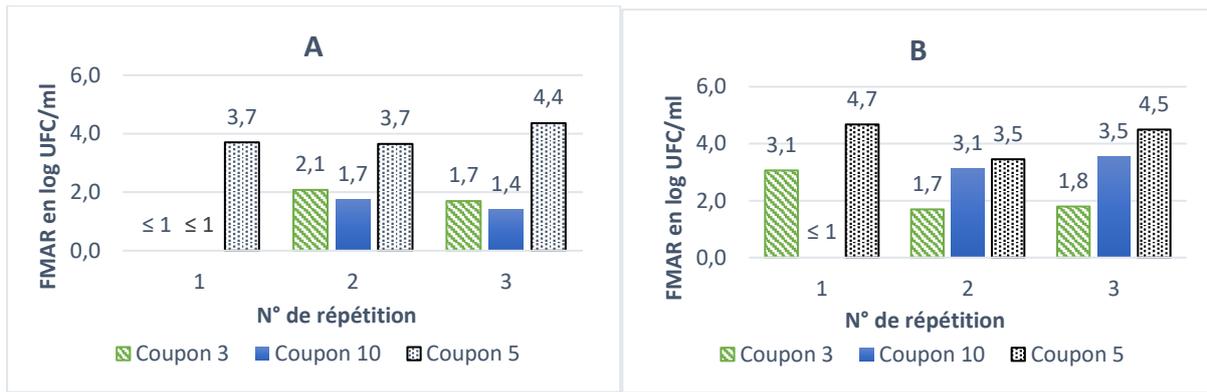
**Figure 7** : Caractérisation et dénombrement des microflore implantées dans le pilote

Les zones du pilote jugées sensibles ne sont pas exemptes de micro-organismes. La flore mésophile aérobique 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 log UFC/ml à 7,4 log UFC/ml (figure 8).



**Figure 8** : Dénombrement de la FMAR écouvillée dans différentes zones du pilote au cours des essais

Une microflore s'est également installée sur les coupons (figure 9), elle est un peu plus importante pour la modalité 2 jours d'implantation (figure 9B). Il s'agit majoritairement de microflore d'altération, bien que les microflore d'intérêt soient plus développées pour la deuxième modalité.

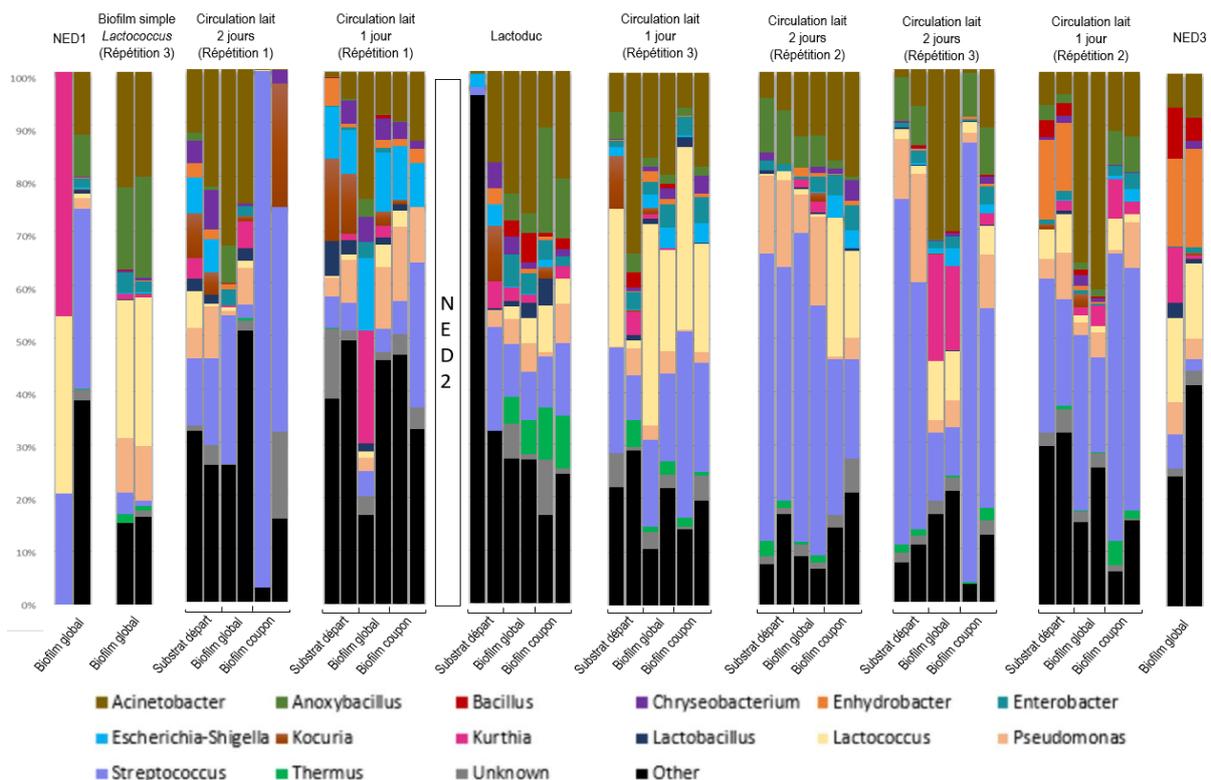


**Figure 9** : Dénombrement de la FMAR prélevée sur les coupons pour 1 jour (A) et 2 jours d'implantation (B)

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.

### 3.2.4. Analyse de la composition des biofilms par metabarcoding

L'analyse par metabarcoding permet de caractériser précisément le biofilm résident du pilote et de déterminer l'effet des différents protocoles d'implantation sur la modification du biofilm. La figure 10 présente l'abondance relative des principaux genres bactériens selon les essais. Entre le début et la fin des essais, le biofilm résident s'est enrichi et diversifié (NED1 et NED3). Globalement, les germes retrouvés sont représentatifs des contaminants naturels du lait, de l'eau ou de l'environnement.

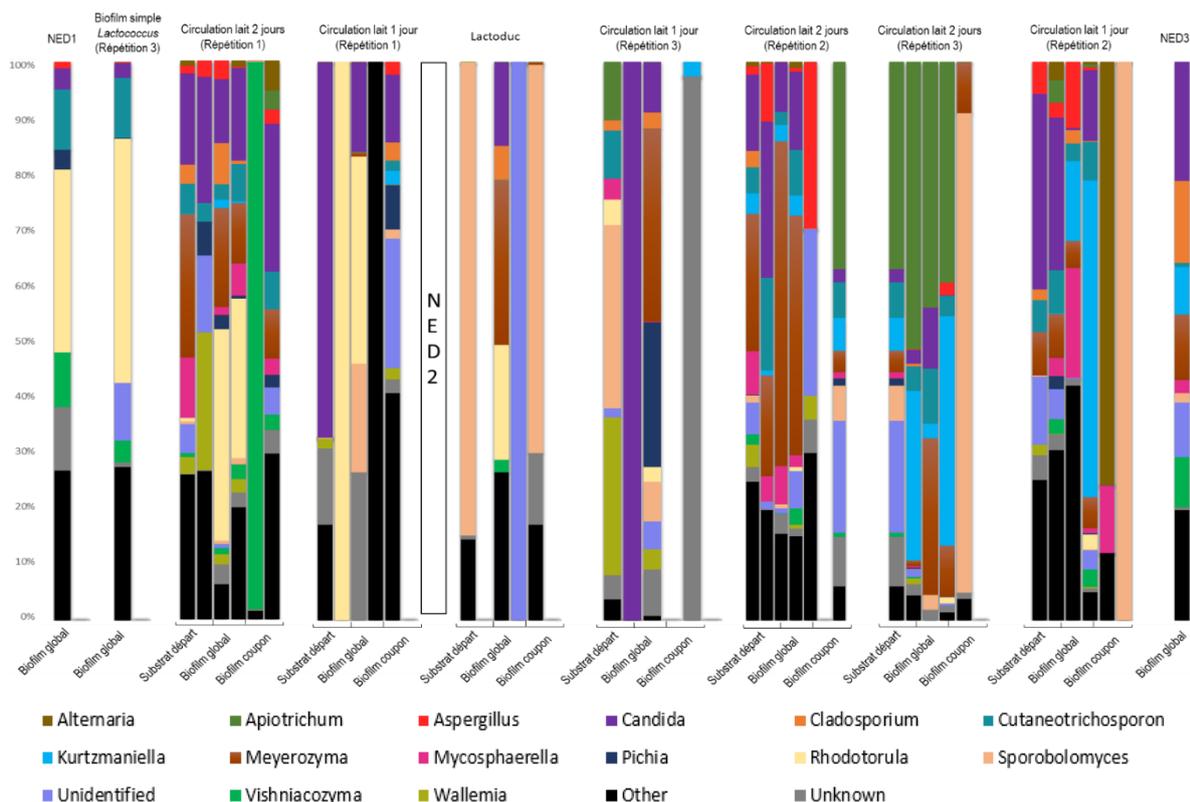


**Figure 10** : Abondance relative des principaux genres bactériens en fonction des essais

Dans les substrats de départ (lait issu d'une ferme voisine ou lactoduc prélevé sur l'installation du Pradel), les genres majoritairement présents sont *Streptococcus* (24 %), *Acinetobacter* (11 %), *Pseudomonas* (8 %) et *Kocuria* (5 %). Après implantation de ces vecteurs sur la machine à traire pilote, le biofilm global qui s'installe dans le dispositif est constitué d'*Acinetobacter* (21 %), *Streptococcus* (15 %), *Lactococcus*

(11 %), *Pseudomonas* (6 %) et *Anoxybacillus* (5 %). Sur les coupons, les genres majoritairement représentés sont similaires : *Streptococcus* (33 %), *Acinetobacter* (12 %), *Lactococcus* (11 %) et *Pseudomonas* (5 %). Dans les échantillons prélevés après nettoyage et désinfection (NED 1 et NED 3), les genres bactériens *Lactococcus*, *Kurthia*, *Streptococcus*, *Anoxybacillus* et *Acinetobacter* composent majoritairement le biofilm résident de la machine à traire pilote.

En comparaison au dénombrement microbien, la flore lactique est bien abondante avec les 2 méthodes d'analyses. Les résultats obtenus pour les bactéries à Gram négatif (et les *Pseudomonas* en particulier) sont plus discordants.



**Figure 11** : Abondance relative des principaux genres fongiques en fonction des essais

Concernant la flore fongique, les champignons principalement retrouvés dans les substrats de départ sont représentés par des isolats des genres *Candida* (18 %), *Sporobolomyces* (12 %), *Apioirichum* (10 %), *Meyerozyma* (8 %), *Wallemia* (5 %) et *Cutaneotrichosporon* (5 %). Dans le biofilm global mobilisable de la machine à traire, les principaux genres identifiés sont *Meyerozyma* (27 %), *Rhodotorula* (14 %), *Candida* (11 %), *Kurtzmaniella* (6 %) et *Apioirichum* (5 %). Sur les coupons, les genres suivants ont été identifiés : *Sporobolomyces* (33 %), *Alternaria* (22 %) et *Vishniacozyma* (7 %) (figure 11). Ainsi, à l'inverse de ce qui a pu être observé pour les bactéries, la composition du microbiote fongique est très différente en fonction du type d'échantillon étudié. La majorité des genres identifiés représente des levures. Une forte variabilité de la composition du microbiote fongique est constatée. Il est intéressant de noter que *Rhodotorula* et *Vishniacozyma* sont détectés lors des premiers essais, mais ne le sont plus lors des trois dernières manipulations. A l'inverse, le genre *Kurtzmaniella* est détecté en abondance lors des derniers essais, alors qu'il est minoritaire ou non détecté lors des premières manipulations. Ainsi, à la lumière de ces résultats, il semblerait que la composition du microbiote fongique dans la MAT pilote soit plus largement impactée que la flore bactérienne par la mise en œuvre successive de protocoles d'implantation de biofilms.

L'étude par une approche de métagénomique ciblée de la microflore présente dans la MAT pilote a permis la caractérisation du biofilm résident. Ce biofilm 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. Lors d'une étude du microbiote de tanks à lait, la prédominance de bactéries appartenant aux genres *Acinetobacter* et *Streptococcus* a été mise en évidence (Sun *et al.*, 2022). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus dans le cadre du projet PiloTraite. Cependant, deux ans auparavant, une autre étude, décrivant cette fois-ci les biofilms présents dans des MAT, avait démontré également la présence d'*Acinetobacter*, mais pas celle de streptocoques (Weber *et al.*, 2019). Il est toutefois intéressant de noter qu'un marqueur de viabilité (PMA) avait été utilisé dans cette étude de métagénétique ciblée pour identifier préférentiellement les bactéries viables. Il pourrait être intéressant, dans la continuité du projet PiloTraite, de répéter l'analyse par metabarcoding sur des échantillons prélevés dans la MAT pilote en prenant en compte la viabilité des isolats identifiés. Cette analyse complémentaire permettrait la confrontation des résultats obtenus en métagénétique ciblée à ceux acquis par dénombrement microbien. En effet, si les analyses FlorAcq réalisées dans ce projet confirment l'abondance de la flore lactique, les résultats obtenus pour les bactéries à Gram négatif (et les *Pseudomonas* en particulier) sont plus discordants. L'analyse métagénétique permet de mettre en évidence la présence importante de genres microbiens habituellement non recherchés en microbiologie culturale, mais pour lesquels il serait intéressant d'en apprendre davantage.

## 4 Conclusion

En consultant l'ensemble des acteurs de la filière laitière, l'outil PiloTraite, MAT pilote, a été conçu pour répondre à de multiples questions sur la qualité du lait en lien avec la MAT. A l'interface entre le laboratoire et la ferme, celui-ci permettra de mener des essais poussés et de pouvoir apporter des réponses aux filières.

Les premiers essais effectués ont permis de définir les modalités d'implantation et de destruction des biofilms au sein de l'installation. Ainsi, malgré un protocole de nettoyage et désinfection drastique, un biofilm résident est établi dans le pilote et ne peut être complètement éliminé avant chaque essai. Ce dernier contient des microflore d'intérêt et des microflore d'altération et est assez représentatif de la diversité des microflore observables en ferme. Il peut être enrichi et modifié par l'apport de microflore présentes dans le lait mis en circulation dans le pilote. Par ailleurs, un temps de circulation plus long favorise l'implantation de biofilm. L'analyse par metabarcoding a permis d'approcher la diversité de microflore rencontrée dans une machine à traire.

Les procédures d'implantation et de destruction de biofilm dans le pilote étant désormais maîtrisées, l'une des prochaines expérimentations pourrait 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.

En conclusion, la conception de PiloTraite a permis de mettre au point un outil stratégique et modulable, à l'interface entre le laboratoire et le terrain, pour répondre aux nombreuses questions des filières laitières sur la qualité du lait, qu'elles soient en lien avec la microbiologie ou la nature physico-chimique du produit. A notre connaissance, il n'existe pas d'outil équivalent à l'échelle internationale.



## **Ethique**

Les auteurs déclarent que les expérimentations ont été réalisées en conformité avec les réglementations nationales applicables.

## **Déclaration sur la disponibilité des données et des modèles**

Les données qui étayent les résultats évoqués dans cet article sont accessibles sur demande auprès de l'auteur de correspondance de l'article.

## **Déclaration relative à l'Intelligence artificielle générative et aux technologies assistées par l'Intelligence artificielle dans le processus de rédaction.**

Les auteurs n'ont pas utilisé de technologies assistées par intelligence artificielle dans le processus de rédaction.

## **Contributions des auteurs**

Le projet PiloTraite a été géré par Cécile LAITHIER, Alice HUBERT et Jean-Louis POULET. Le concept et la méthodologie du projet ont été réfléchis et mis au point par l'ensemble des acteurs. Les données ont été traitées par Alice HUBERT, Jean-Louis POULET, Morgan GUILBAUD, Jean-Marie HERRY, Valérie MICHEL, Aurélie HANIN, Nicolas ROSSI, Sawsen DEHAINE, Gwenaëlle JARD et Hélène TORMO. Régis PERION, Romain CHERON et Aurore MORAZIN, de l'entreprise Kersia, ont permis le co-financement d'acquisition. Nadia OULAHAL a également permis d'obtenir des ressources nécessaires au projet.

Cet article a été rédigé par Chloé DESMOUSSEAUX, Cécile LAITHIER, Alice HUBERT et Jean-Louis POULET. Tous les auteurs ont participé à la révision et à la validation de la publication.

## **Déclaration d'intérêt**

Les auteurs déclarent ne pas travailler, ne conseiller, ne pas posséder de parts, ne pas recevoir pas de fonds d'une organisation qui pourrait tirer profit de cet article, et ne déclarent aucune autre affiliation que celles citées en début d'article.

## **Remerciements**

Nous remercions tous les partenaires et éleveurs ayant participé au projet.

## **Déclaration de soutien financier**

Ce projet a été financé par le CASDAR et l'entreprise Kersia.

## **Références bibliographiques :**

ACTALIA, ENIL de Mamirolle, BioDyMIA, FEMTO-ST, and CETIM. 2016. Rapport technique final du programme ECOCLEAN : Mise en place d'un dispositif d'analyse de l'efficacité et de l'impact environnemental de couples produits/procédés de nettoyage-désinfection d'une ligne laitière.

Brauge, T., L. Barre, G. Leleu, S. André, C. C. Denis, A. Hanin, B. Fremaux, M. Guilbaud, J.-M. Herry, N. Oulahal, B. Anger, C. Soumet, and G. Midelet. 2020. European survey and evaluation of sampling methods recommended by the standard EN ISO 18593 for the detection of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on industrial surfaces. *FEMS Microbiology Letters*. 367:fnaa057. doi:10.1093/femsle/fnaa057.

EHDG Guidelines. 2023. Doc. 2 A method for assessing the in-place cleanability of food processing equipment. Available from: <https://www.ehdg.org/guidelines-working-groups/guidelines/guidelines/detail/a-method-for-assessing-the-in-place-cleanability-of-food-processing-equipment>

Laithier, C., Y. Chatelin, R. Talon, J. Barral, H. Tormo, and Y. Lefrileux. 2005. Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage/désinfection sur la sélection positive des biofilms. In: p. 367–370.



Laithier, C., and F. Dartailh. 2014. Matériel de traite et aptitude du lait cru à la transformation en technologie lactique caprine : étude des outils de diagnostic. Collection Résultats. Institut de l'Élevage. Compte-rendu n°00 14 403 050.

Marchand, S., J. De Block, V. De Jonghe, A. Coorevits, M. Heyndrickx, and L. Herman. 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11:133–147. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x.

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 - Réseau Fromages de Terroir. Paris. 129 p. Available from: <https://www.rmtfromagesdeterroirs.com/themes-de-travail/microflores-des-laits-et-des-fromages/>

Sun, L., Å. Lundh, A. Höjer, G. Bernes, D. Nilsson, M. Johansson, M. Hetta, A. H. Gustafsson, K. H. Saedén, and J. Dicksved. 2022. Milking system and premilking routines have a strong effect on the microbial community in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*. 105:123–139. doi:10.3168/jds.2021-20661.

Tremblay, Y. D. N., S. Hathroubi, and M. Jacques. 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res*. 78:110–116.

Weber, M., J. Liedtke, S. Plattes, and A. Lipski. 2019. Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and -independent methods. *PLOS ONE*. 14:e0222238. doi:10.1371/journal.pone.0222238.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue *Innovations Agronomiques* et son DOI, la date de publication.