

COMPTE RENDU D'ESSAI – ACTION 3.1

Quels sont les effets de l'ajout d'un ensemencement des tapis sur les communautés microbiennes du couchage, des trayons et des laits

Date : 01/12/2025

Rédaction : Cresciense Lecaude (contact : cresciense.lecaude@ceraq.fr)

Relecture : Léa Carlesso (Ceraq) + COPIL

1. CONTEXTE

Le projet PEPIT « Litières » étudie les zones de couchage des animaux, considérées comme des réservoirs microbiens au croisement des enjeux sanitaires et de la qualité microbiologique des laits et fromages. Les litières constituent un milieu favorable au développement des microorganismes (température, humidité, apport de matière fécale), lesquels peuvent se transférer vers le lait cru via l'air, la litière ou la machine à traire.

Ce projet répond à une demande des filières fromagères, qui disposent de peu de visibilité sur les pratiques de gestion des litières et leurs impacts sur les microbiotes. Mieux comprendre ces pratiques permet d'orienter les gestions de litières afin de favoriser les microflore bénéfiques et limiter les microflore pathogènes.

Porté par le CERAQ, le projet associe le Pôle Fromager AOP Massif Central, le FDCL, la Chambre d'Agriculture du Cantal, VetAgro Sup et les Éleveurs des Savoie. Initié en 2021, il se décline en trois sous-objectifs :

Caractériser les écosystèmes microbiens des litières (diversité, structuration, microflore utiles et indésirables, interactions microbiennes).

Recenser les pratiques de gestion des litières en Auvergne-Rhône-Alpes.

Évaluer les effets de pratiques de gestion susceptibles de favoriser un écosystème microbien favorable.

Le premier et deuxième sous-objectifs ont été traités avant l'intervention actuelle : un dispositif de prélèvement a permis de comparer les écosystèmes microbiens des différents systèmes de logement-litière, tandis que des enquêtes et entretiens auprès d'éleveurs (n = 257) ont recensé les pratiques de gestion des litières.

Les résultats révèlent que 33 % des éleveurs utilisent des additifs, dont 43 % contenant des microorganismes. Amélioration 7,5 % constatent des effets positifs (réduction des mammites et boiteries,

amélioration de la qualité du lait et de la propreté des animaux), mais 67 % estiment manquer d'informations sur les effets des produits sur les écosystèmes microbiens (Fournier, 2022).

Au regard du rôle des litières dans le transfert des microorganismes vers le lait cru, la problématique retenue est :

« Quels sont les effets d'un produit d'ensemencement, au cours du temps, sur les écosystèmes microbiens des litières, des trayons et du lait, au regard des enjeux des filières au lait cru ? »

Les deux sous-questions sont :

- Les microorganismes contenus dans le produit se dispersent-ils ou se développent-ils après utilisation ?
- Quels sont les impacts du produit sur les microflore positives et négatives des écosystèmes étudiés ?

Pour y répondre, une expérimentation est conduite durant l'hiver 2023-2024 par le CERAQ et le Pôle Fromager, avec une méthodologie d'échantillonnage scientifique garantissant rigueur et reproductibilité.

2. MATERIEL & METHODES

2.1. Plan d'expérimentation

L'expérimentation a été menée durant l'hiver 2023-2024 afin d'étudier l'impact d'un produit d'ensemencement sur les écosystèmes microbiens des litières, des trayons et du lait. Quatorze exploitations ont été sélectionnées (4 en Savoie, 3 dans le Massif Central par groupe) et réparties en deux groupes :

- Groupe Témoin : pas de modification des pratiques d'élevage.
- Groupe Ensemencement : application d'un produit contenant des microorganismes sur les zones de couchage.

Chaque groupe a été étudié sur trois périodes : état initial, effet à court terme (semaine suivant la dernière application) et effet à long terme (trois semaines après l'application). Chaque période comprenait trois jours consécutifs de prélèvements afin de réaliser trois répétitions et renforcer la robustesse de l'étude. Entre l'état initial et le court terme, le produit a été appliqué six fois dans les exploitations du groupe Ensemencement – à raison de 200g de produit par logette. La chronologie des prélèvements est illustrée dans la figure 1.

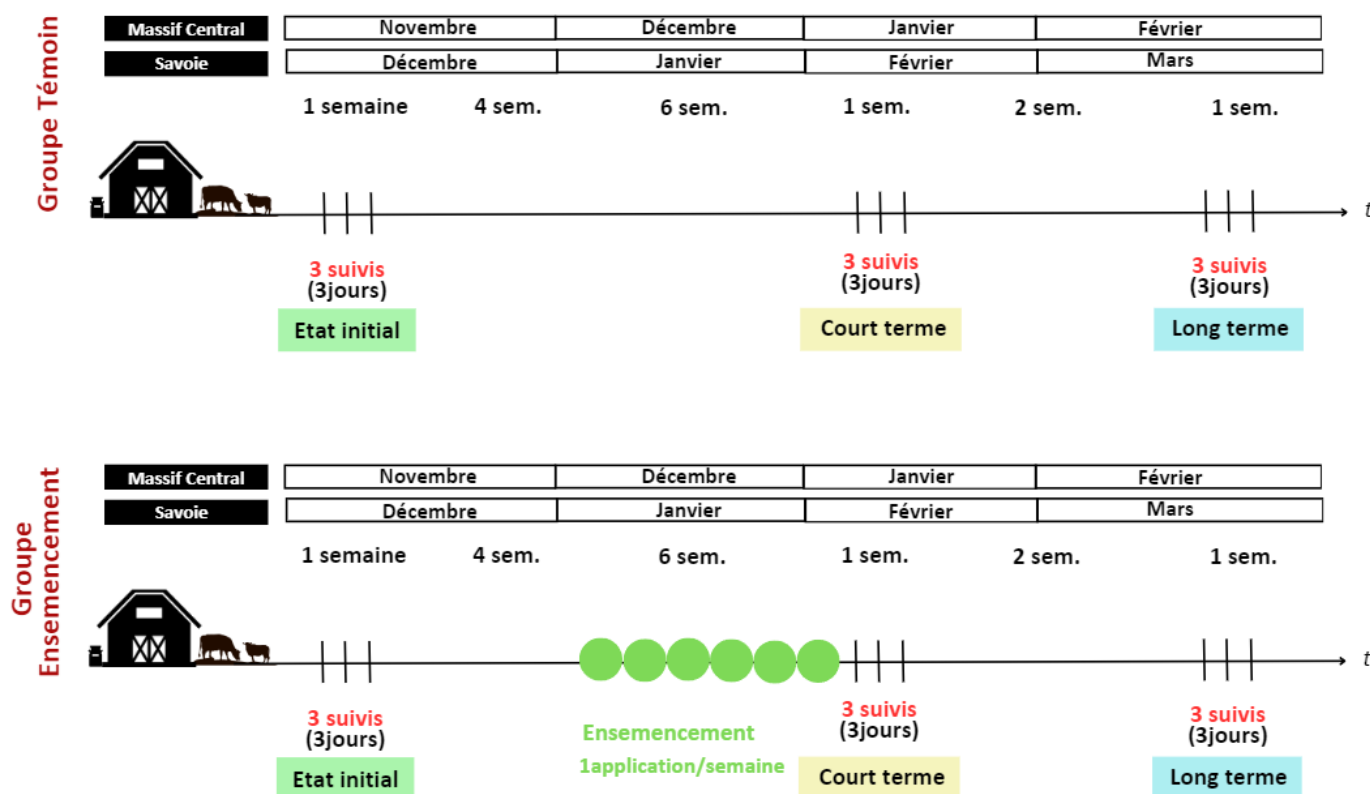


Figure 1 - Chronologie des suivis des fermes selon les groupes témoins et ensemencement

Les prélèvements ont été effectués sur :

- Les tapis des zones de couchage (tiers arrière des logettes, via pédichiffonnette),
- La surface des trayons avant la traite (frotti avec lingettes stériles sur 10 vaches aléatoires),
- Le lait dans le tank (louchet stérile à la fin de la traite).

2.2. Sélection des exploitations

Les exploitations ont été choisies selon plusieurs critères pour limiter la variabilité :

- Localisation en Savoie ou dans le Massif Central,
- Absence d'utilisation préalable de produits d'ensemencement,
- Système de logette tapis (réduction de la variabilité microbienne observée dans l'essai précédent),
- Pratiques d'élevage homogènes, idéalement sous AOP, pas d'ensilage ni d'enrubannage,
- Pas de robot ou roto de traite (facilite les prélèvements).

En Savoie, les fermes ont été sélectionnées dans le Massif des Bauges et le Beaufortain, où la densité d'exploitations en logette tapis est élevée et les pratiques homogènes. Les exploitations choisies dans ces deux territoires présentaient également une variance réduite lors de l'étude menée dans le cadre de l'action 1. Les exploitations produisent sous signes de qualité AOP (Tome des Bauges et Beaufort), garantissant des pratiques d'élevage similaires, règlementées par les cahiers des charges.

2.3.Choix du produit d'ensemencement et prélève

Une enquête téléphonique, menée auprès de vétérinaires pour mieux cerner les pratiques majoritaires et conseillées en termes d'utilisation de produits d'ensemencement, a permis de sélectionner le produit utilisé dans le cadre de cette étude.

Ce dernier, notamment retenu pour sa composition en microflore, contient :

- Une flore acidifiante (bactéries lactiques),
- Une flore « anti-pathogènes » (*Bacillus subtilis*).

Le produit a été appliqué une fois par semaine pendant six semaines sur le tiers arrière des logettes, à raison de 200 g/logette, conformément aux recommandations du fabricant. Cette zone correspond au contact direct avec les trayons et la mamelle (figure 2).



Figure 2 - Produit d'ensemencement appliqué sur le tiers arrière des logettes et contact avec les trayons (Photo – B. Polturat, 2024)

À chaque suivi, la même série de prélèvements est réalisée.

➔ PRELEVEMENTS SUR LES ZONES DE COUCHAGE :

Ils sont effectués à la surface des tapis, sur le tiers arrière de la logette, à l'aide d'une botte lestée recouverte d'une pédichiffonnette. Pour constituer un échantillon, 40 pas sont réalisés sur un minimum de dix logettes. Des photographies illustrant la méthodologie sont présentées en annexe 1.

➔ PRELEVEMENTS A LA SURFACE DES TRAYONS :

Ils sont réalisés avant toute intervention de l'éleveur à la traite, c'est-à-dire avant le nettoyage et le pré-trempe des trayons. Les prélèvements sont effectués par frottis à l'aide de lingettes stériles. Une lingette est utilisée par vache et permet d'essuyer deux trayons opposés. Afin d'obtenir un échantillon représentatif du troupeau, dix vaches sont choisies aléatoirement au cours de la traite.

→ PRELEVEMENTS DE LAIT :

Les échantillons de lait sont collectés dans le tank à la fin de la traite, à l'aide d'une louche stérile introduite via le trou d'homme.

2.4. Facteurs environnementaux : Pratiques d'élevage et mesures physico-chimiques

Des enquêtes agronomiques auprès des éleveurs ont permis de recueillir plusieurs informations concernant leurs pratiques d'élevage, à savoir : taille du troupeau, pratiques de gestion des zones de couchage, pratique de traite, état et ambiance du bâtiment, alimentation et aspects sanitaires. Un guide d'entretien a été construit pour mener ce travail d'enquêtes et est accessible dans le mémoire de stage de Julia Bondat (section « Données complémentaires »).

Des observations ont également été réalisées dans les bâtiments : propreté des logettes et des vaches (grille Canadian Bovine Mastitis Research Network), ventilation et conditions ambiantes du bâtiment.

Les mesures physico-chimiques, quant à elles, comprenaient :

- La Température et l'hygrométrie de l'air, mesurées en trois points distinct du bâtiment, à l'aide d'une sonde thermo-hygrométrique,
- Le pH à la surface des tapis, relevé sur trois logettes et trois zones par logette avec un pH-mètre Soilstick et conformément au protocole recommandé par le fabricant de la sonde,
- La température de surface des tapis, réalisée dans trois zones du tiers arrière d'une même logette, puis répétée sur trois logettes.

2.5. Analyses microbiologiques

→ ANALYSES PASTEURIENNES

Ces analyses ont eu pour objectif de dénombrer :

- Flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR, NF EN ISO 4833-1),
- Bactéries lactiques mésophiles (Milieu MRS + inhibiteurs),
- Bactéries d'affinage (C. Denis et al., 2001)
- *Bacillus spp.* mésophiles vivants,
- Spores de *Bacillus spp.* mésophiles.

Les analyses ont été réalisées sur 378 échantillons (216 en Savoie, 162 dans le Massif Central).

→ METABARCODING ADN 16S

Le métabarcoding ADN 16S a été utilisé pour identifier et caractériser la diversité des bactéries présentes. Trois répliques biologiques ont été réalisées pour les zones de couchage et le lait (Savoie uniquement). Les amorces utilisées et le protocole de PCR ont été choisis suivant Verdiez-Metz et al, 2023. Les prélèvements ont été traités par ACTALIA, puis l'ADN extrait, amplifié et séquencé à l'UMR Fromages de l'INRAE, avec analyses bio-informatiques et biostatistiques pour évaluer la composition, la diversité et les interactions des microbiotes.

Les levures et moisissures n'ont pas été étudiées.

Des répliques biologiques ont été réalisés pour limiter la variation due à la méthode d'échantillonnage. Les analyses ont été effectuées en respectant les contraintes de moyens disponibles et le minimum d'échantillons nécessaire pour détecter un effet faible.

→ LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES REALISEES SONT LES SUIVANTES :

Échantillons de surfaces de tapis, de trayons et de lait (sans répliques)

- Flore mésophile aérobie revivable (FMAR) — NF EN ISO 4833-1
- Bactéries mésophiles lactiques — milieu MRS + inhibiteurs
- Bactéries d'affinage — méthode C. Denis *et al.*, 2001
- *Bacillus* spp. mésophiles vivants / Gram négatif — milieu BCP
- Spores de *Bacillus* spp. mésophiles / Gram négatif — milieu BCP avec thermochoc

Produits (3 répliques)

- Flore mésophile aérobie revivable (FMAR) — NF EN ISO 4833-1
- *Pseudomonas* — milieu CFC
- *Bacillus* spp. mésophiles vivants / Gram négatif — milieu BCP
- Spores de *Bacillus* spp. mésophiles / Gram négatif — milieu BCP avec thermochoc
- Bactéries mésophiles lactiques — milieu MRS + inhibiteurs
- Bactéries d'affinage — méthode C. Denis *et al.*, 2001

Recherche des souches dominantes (3 répliques)

- Isolement des souches les plus abondantes
- Identification primaire par MALDI-TOF
- Séquençage complet du génome (WGS) – prévu en 2026

Les souches ont été recherchées sur les milieux suivants : MRSi, M17 (recherche des thermophiles), TSA (FMAR), BCP (*Bacillus* et Gram négatif)

→ PERSPECTIVES 2026

Si le séquençage complet WGS est concluant, une recherche ciblée de ces souches est prévue dans les échantillons tapis / trayons / lait à l'aide des amorces fournies par le fabricant.

2.6. Analyses statistiques et bio-informatiques

Le traitement des données génétiques a été réalisé avec FROGS sur un environnement Linux via Anaconda. Pour affilier au mieux les amplicons à leur taxonomie, plusieurs bases de données ont été utilisées : DairyDB, EzBioCloud et SILVA. Les affiliations présentant les meilleurs scores ont ensuite été conservées.

Les analyses suivantes ont été réalisées sous R :

- Les comparaisons par groupes ont été effectuées principalement avec des tests non paramétriques : Kruskal-Wallis avec ajustement de Benjamini-Hochberg ou Wilcoxon. Lorsque les conditions le permettaient et que deux groupes étaient comparés, le test de Welch a été utilisé.
- Les NMDS, utilisées pour comparer les beta-diversités, ont été calculées à partir de la distance de Bray-Curtis, et la PERMANOVA associée a été réalisée avec 1000 permutations.
- Les tests différentiels pour les comparaisons par périodes ou groupes ont été effectués avec le package ANCOMBC (version 2).
- Les analyses de réseaux ont été réalisées avec le package ggclusternet.

L'assemblage des génomes, à venir, sera réalisé sur un environnement Bash/Python.

3. RESULTATS

3.1. Résultats métabarcoding du produit

Les PCR réalisées sur la poudre ont été difficiles à mettre en œuvre en raison de la forte absorbance du produit, qui perturbe l'efficacité des solvants d'extraction.

Malgré ce biais, quelques bactéries lactiques ont pu être détectées, notamment *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Anaerococcus lactolyticus* (également retrouvée sur les tapis) et *Lactobacillus amylovorus* (Figure 3).

On observe également une présence importante de bactéries caractéristiques de milieux acides, comme ceux du vinaigre, certaines étant capables de produire de l'acide acétique.

Enfin, quelques espèces impliquées dans la détoxification des boues, telles que des *Novosphingobium*, ont également été identifiées.

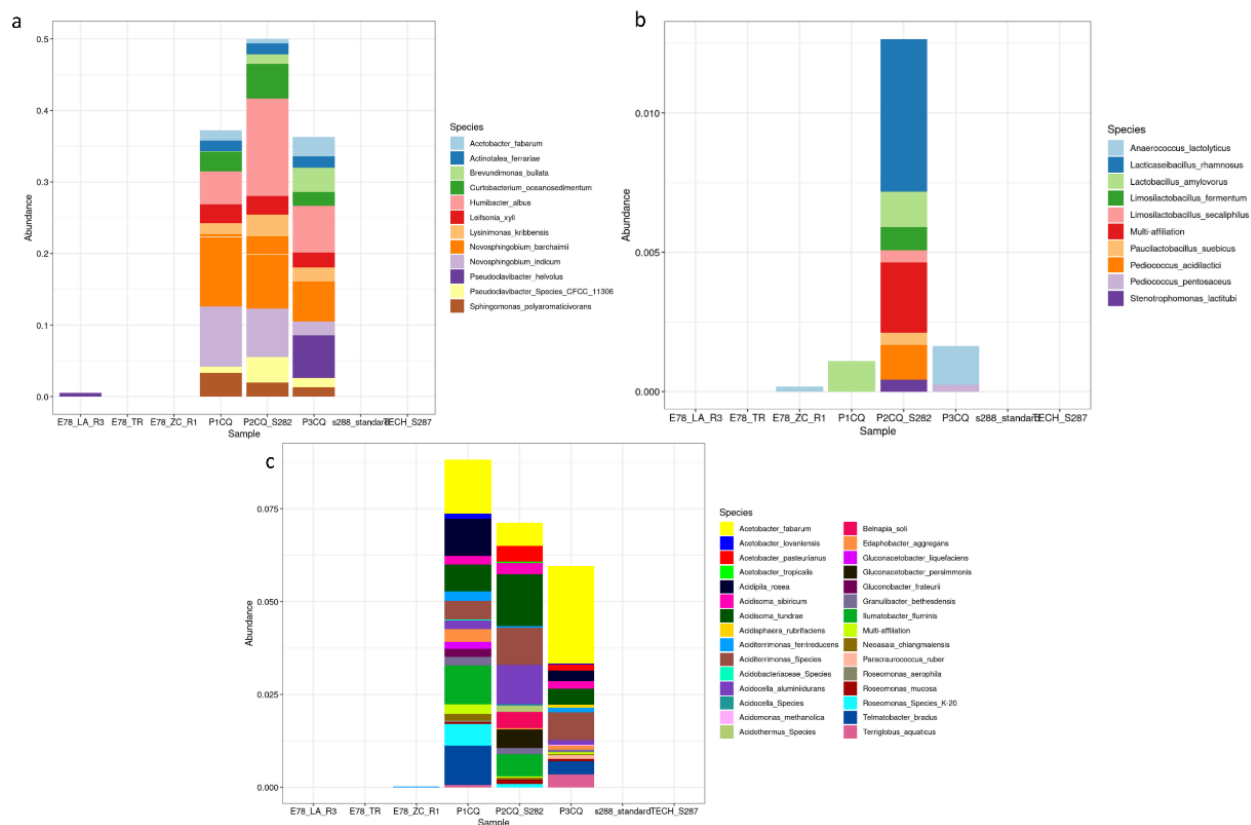


Figure 3 - Représentation des différents groupes retrouvés en métabarcoding dans le produit. A: Les espèces les plus abondantes. B: Les bactéries lactiques. C: Les bactéries acétiques

3.2. Résultats pasteurienne pour Maldi-Tof et isolats du produit d'ensemencement

Le nombre d'isolats peut varier de manière notable selon la boîte analysée, en particulier pour les bactéries lactiques mésophiles et les bactéries thermophiles (Figure 4).

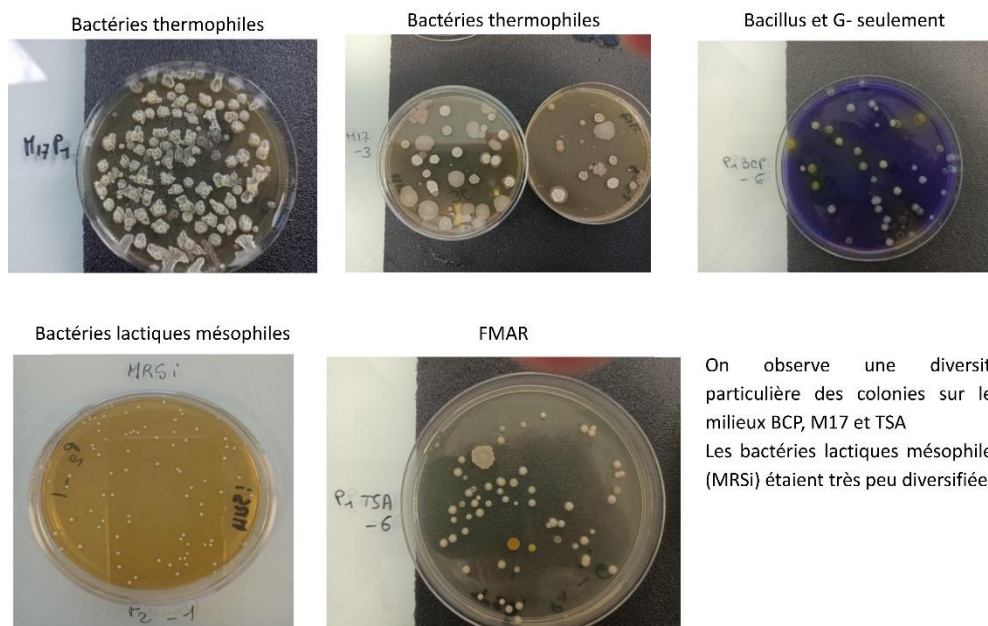


Figure 4 - Photographies des colonies poussant sur milieux de cultures M17, BCP, MRSi et TSA

On observe une diversité particulière des colonies sur les milieux BCP, M17 et TSA
Les bactéries lactiques mésophiles (MRSi) étaient très peu diversifiées

Bacillus subtilis est retrouvé en quantité non négligeable dans les trois boîtes (Tableau 1), avec une présence clairement identifiable de la sous-espèce subtilis. La détection de *Bacillus cereus-thuringiensis*, utilisé comme biopesticide, pourrait résulter d'une contamination croisée.

Milieux	P1	P2	P3
BCP 30°C	7,6 5 isolats BCP P1	7,5 6 isolats BCP P2	7,2 3 isolats BCP P3
TSA 30°C	7,7 9 isolats TSA P1	7,7 5 isolats TSA P2	7,5 5 isolats TSA P3
MRSi 30°C	2,5 2 isolats MR P1	4,3 8 isolats MR P2	2,6 3 isolats MR P3
M17 42°C	4,1 10 isolats M17 P1	4,2 4 isolats M17 P2	4,2 4 isolats M17 P3

espèces identifiées	estimation (ufc/g)	Poudres		
<i>Bacillus subtilis</i>	1,00E-06	P1	P2	P3
<i>Bacillus cereus-thuringiensis</i>	1,00E-06	P1	P2	P3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5,00E-06	P1	P2	P3
<i>Pseudomonas gessardii</i>	1,00E-07	P1	P2	P3
<i>Serratia liquefaciens</i>	1,00E-06		P2	P3
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	4,00E-06	P1	P2	P3
<i>Escherichia coli</i>	1,00E-06			P3
<i>Microbacterium arborescens</i>	4,00E-06	P1		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,00E-04	P1	P2 (1,0 E-2)	P3 (1,0 E-2)
<i>Peribacillus simplex</i>	1,00E-03		P2	P3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,00E-04	P1		
<i>Cupriavidus gilardii</i>	1,00E-03			P3
<i>Priestia megaterium</i>	1,00E-03			P3

Tableau 1 - Nombre d'isolats comptés par milieu de culture, association spécifique et estimation de leur abondance.

Stenotrophomonas maltophilia et *Pseudomonas gessardii* sont des bactéries fréquemment rencontrées dans l'eau ; leur présence pourrait s'expliquer par une contamination au cours du processus de fabrication. *Serratia liquefaciens*, quant à elle, est une espèce courante des sols et peut conférer aux plantes des résistances intéressantes contre certains phytopathogènes.

Chryseobacterium indologenes est une bactérie ubiquiste, régulièrement observée dans le sol, l'eau ou les végétaux. *Pediococcus pentosaceus* est une bactérie lactique connue pour produire de la pédiocine, une bactériocine fortement antimicrobienne.

Les *Lactobacillus* détectés en métabarcoding ne sont pas retrouvés ici, probablement en raison de leurs difficultés de croissance sur milieu gélosé en conditions aérobies.

3.3. Contextualisation selon les élevages

Les exploitations savoyardes disposent en moyenne de 148 hectares de surface agricole utile (SAU) pour 2,68 unités de travail humain (UTH), contre 94 hectares de SAU et 1,66 UTH dans le Massif central. Le cheptel bovin laitier se compose en moyenne de 54,88 vaches laitières en Savoie et de 53,33 vaches dans le Massif central, pour une production annuelle respective de 272 928 litres et 312 000 litres de lait. À l'exception d'une exploitation transformant son lait en fromage directement à la ferme, l'ensemble des exploitations commercialisent leur production auprès d'une coopérative laitière.

Les exploitations étudiées sont réparties équitablement entre les groupes Témoin et Ensemencement. La comparaison de ces deux groupes vise à vérifier l'absence de différences significatives susceptibles d'introduire un biais et de compromettre la validité des conclusions. Aucune différence significative n'a été observée concernant la SAU, les UTH, le nombre de vaches laitières (VL) ou la production annuelle de lait (p-value = 0,84 ; 0,83 ; 0,85 et 0,80 respectivement).

En revanche, une différence significative apparaît quant à la répartition des races bovines entre les groupes. Le groupe Témoin compte davantage de vaches de race Montbéliarde que d'Abondance, tandis que le groupe Ensemencement présente la tendance inverse (p-value = 0,0451). De plus, le nombre de vaches appartenant à d'autres races que la Montbéliarde, l'Abondance ou la Tarine est plus élevé dans le groupe Ensemencement (p-value = 0,0233).

Les labels AOP Cantal, AOP Tome des Bauges et AOP Beaufort sont représentés de manière équilibrée au sein de chaque groupe. Aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant la présence des SIQO. Toutefois, la modalité « Tome des Bauges, Bio » n'est observée que dans le groupe Témoin, une seule exploitation du panel étant engagée en agriculture biologique.

Aucune différence significative n'a été relevée concernant l'ancienneté des tapis de couchage (p-value = 0,66). La vétusté des bâtiments d'élevage est similaire entre les deux groupes (p-value > 0,05), bien que la note 3 — correspondant à un bâtiment « correct, perméable aux intempéries, stable » — n'apparaisse que dans le groupe Ensemencement.

Plusieurs exploitations du groupe Témoin réalisent un vide sanitaire, de manière inversement proportionnelle au groupe Ensemencement, mais cette différence n'est pas significative (p-value = 0,28). Seules deux exploitations sur quatorze procèdent à une désinfection de leurs bâtiments, réparties entre les deux groupes, ne révélant ainsi aucune différence en matière de gestion sanitaire des infrastructures.

Aucune différence significative n'a été observée concernant la fréquence de raclage des logettes (p-value = 0,20).

Les éleveurs ne connaissant pas toujours précisément la composition de la ration hivernale des vaches laitières, les données recueillies sur l'alimentation sont insuffisantes pour permettre une comparaison. De manière générale, les animaux sont nourris principalement au foin de regain. Aucun éleveur n'utilise d'enrubannage ni d'ensilage. Il n'existe pas de différence significative concernant l'origine de l'eau des abreuvoirs (p-value = 1) ni la quantité de concentré distribuée (p-value = 0,39).

Les graphiques illustrant l'ensemble de ces résultats sont disponibles dans le document « Données complémentaires », annexé au mémoire de Julia Bondat.

3.4. Résultats pasteurienne et dynamiques temporelles au cours des suivis

Très peu de signaux ont pu être détectés en pasteurienne, que ce soit sur les tapis, les trayons ou dans les laits.

Les bactéries lactiques mésophiles présentes à la surface des tapis présentent toutefois une tendance à l'augmentation à court terme par rapport à la période initiale dans le groupe Ensemencement, ce qui n'est pas observé dans le groupe Témoin. Une tendance à des valeurs plus élevées en S4 qu'en S3 et S2 est en effet observée (p -value = 0,06 et 0,08). Cette évolution n'est pas retrouvée ni sur les trayons, ni dans les laits (Figure 5).

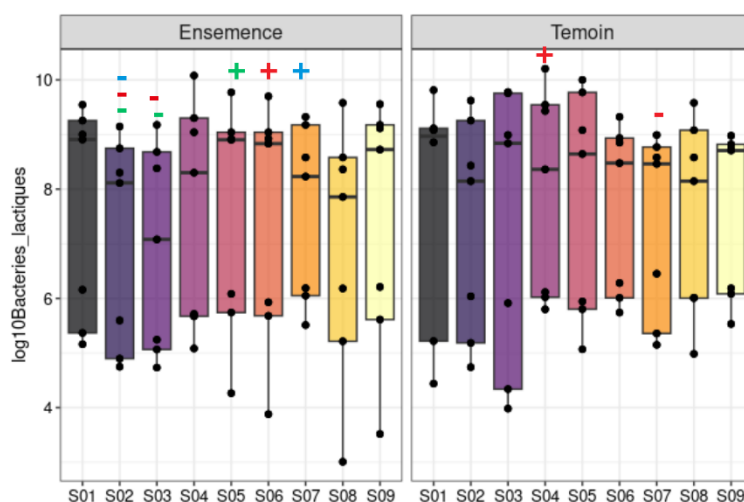


Figure 5 - Abondance des bactéries lactiques (log10 UFC/ml) à la surface des tapis

Concernant les spores de *Bacillus*, une décroissance très significative est observée à court terme dans les deux groupes, aussi bien à la surface des tapis que sur les trayons. Ce résultat indique que l'ensemencement n'augmente pas la charge en spores de *Bacillus*, même à court terme après l'application du produit (Figure 6).

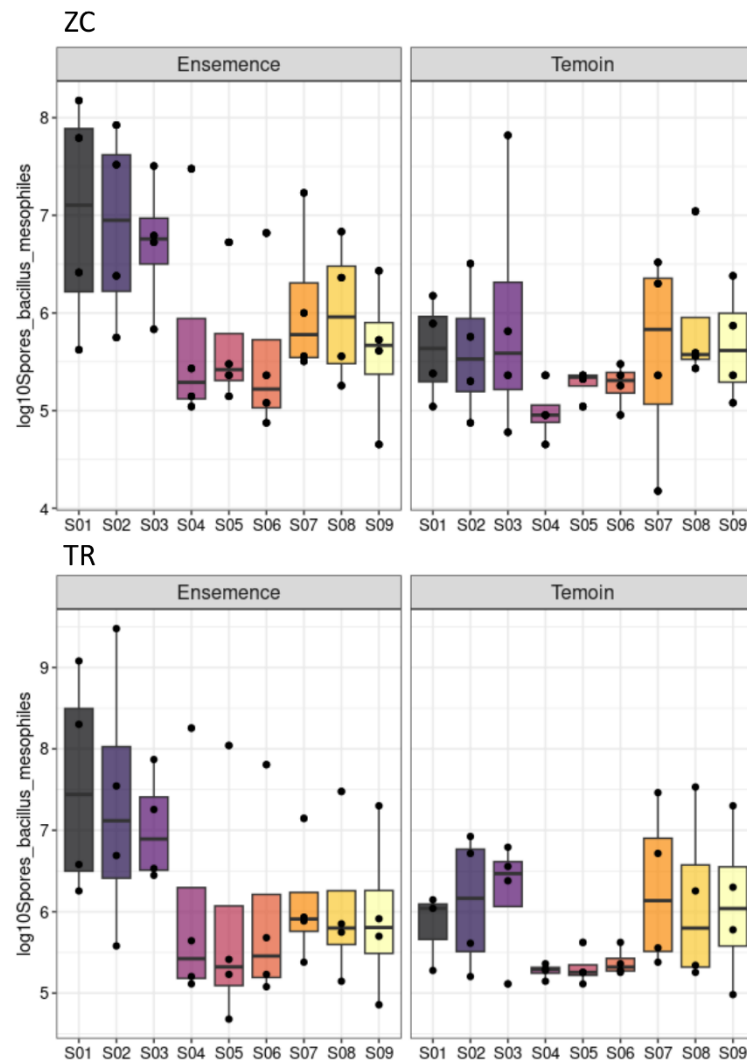


Figure 6 - Abondance des spores de *Bacillus* à la surface des tapis (ZC) et sur les trayons (TR), selon les groupes

Les Bacillus vivants associés au groupe G– ne montrent aucune variation significative entre périodes ni entre groupes, quel que soit le réservoir étudié.

De même, ni la FMAR, ni les bactéries d’affinage ne présentent de signal différentiel, à court ou à long terme, entre les deux groupes, et ce pour l’ensemble des trois réservoirs analysés.

3.5. Evolution du pH des litières après application du produit

Le pH mesuré immédiatement après l’application du produit à la surface des tapis diminue très significativement ($p\text{-value} < 2.2\text{e-}16$), avec une baisse moyenne d’une unité de pH suite à l’application (Figure 7).

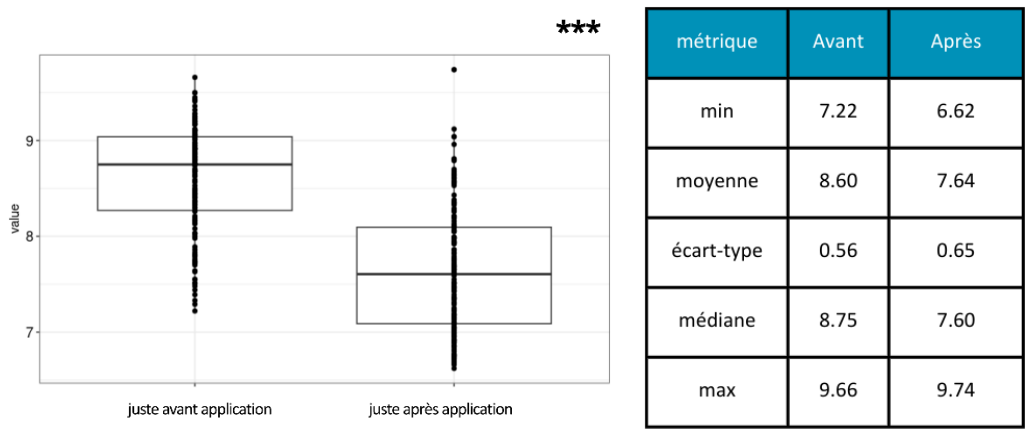
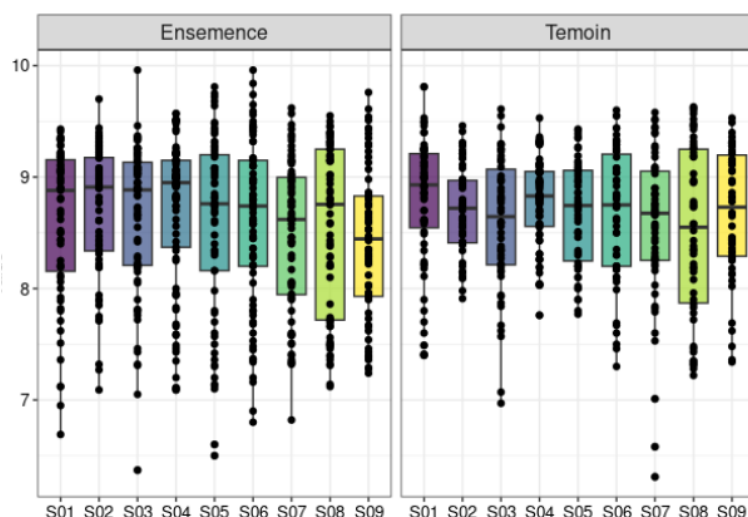


Figure 7 - pH avant et après application du produit à la surface des tapis, et description des métriques statistiques associées

Cette diminution significative n’est cependant pas retrouvée au cours de la période à court terme dans le groupe Ensemencement (Figure 8).

Figure 8 - pH mesuré à la surface des tapis selon les numéros de suivis, par groupe



3.6. Etude de la flore des trayons et des laits en fonction des pratiques

Le produit de post-trempe peut présenter une rémanence variable sur les trayons. Ainsi, même si les lingettes sont utilisées avant la traite, il est possible que le produit appliqué lors de la traite précédente continue d’influencer la flore des trayons à plus ou moins long terme.

Dans le groupe Ensemencement, deux exploitations utilisaient du Fortex en post-trempe, contre une exploitation dans le groupe Témoin. Toutes les flores testées, à l’exception des bactéries lactiques mésophiles, étaient plus abondantes à la surface des trayons du groupe Ensemencement lorsque le Fortex était utilisé. Concernant les laits, la dépendance au groupe est plus limitée : seules la FMAR et les bactéries d’affinage présentent des valeurs plus élevées dans le groupe Ensemencement.

La profondeur d’échantillonnage s’est avérée suffisante pour comparer les niveaux de flores dans les laits en fonction des modes de nettoyage des trayons. Il ressort que les laits du groupe Ensemencement étaient plus chargés en FMAR, Bacillus et bactéries lactiques lorsque la laine de bois était utilisée. En cas d’utilisation de papier, les laits du groupe Ensemencement présentaient des teneurs plus élevées en bactéries d’affinage et en bactéries lactiques (Tableaux 2 et 3).

Ensemencés VS Témoins		
Types de test	Trayons	Lait
Quand utilisation de FORTEX en pré-trempe		
FMAR	E+ (p-value = 9.8e-4)	E+ (p-value = 0.039)

Ensemencés VS Témoins	
Types de test	Lait
Quand utilisation de laine de bois en mode de nettoyage	
FMAR	E+ (p-value = 8e-4)
Bacillus et G-	E+ (p-value = 8e-3)
Bactéries d’affinage	NS
Spores de Bacillus	NS
Bactéries lactiques	E+ (p-value = 0.0253)

Ensemencés VS Témoins	
Types de test	Lait
Quand utilisation de papier en mode de nettoyage	
FMAR	NS
Bacillus et G-	NS
Bactéries d’affinage	E- (p-value < 0.05)
Spores de Bacillus	NS
Bactéries lactiques	E+ (p-value = 0.0459)

Tableau 2 - Test c

dans les laits, lorsque

Tableau 3 - Test des abondances de microorganismes selon les groupes E et T, dans les laits, lorsque le mode de nettoyage est la laine de bois (gauche) ou le papier (droite)

3.7. Diversité de Shannon et richesse selon les réservoirs

L'ajout du produit n'a pas permis de mettre en évidence de différences majeures de diversité ou de richesse des microbiotes entre les groupes, et ce pour l'ensemble des réservoirs étudiés.

La seule exception concerne la richesse en OTU des trayons, qui présente des valeurs significativement plus élevées dans le groupe Ensemencement, et ce dans les deux massifs étudiés (deux fermes dans les Bauges, une seule dans le Beaufortain) (Figure 9).

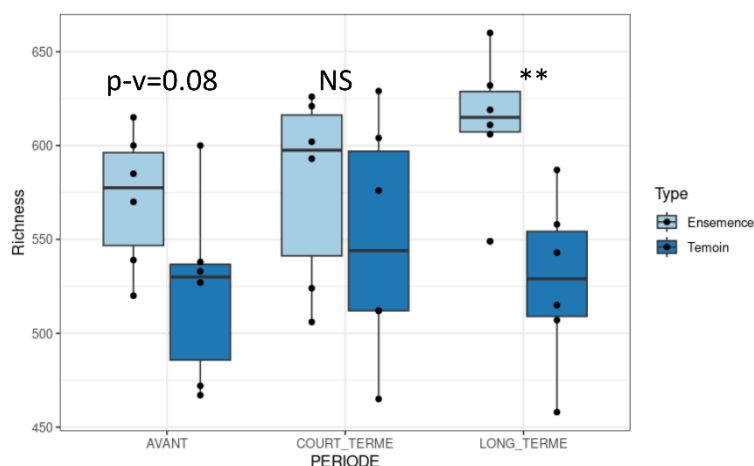


Figure 9 - Richesse en OTU des trayons dans le massif des Bauges, comparée selon les groupes et les périodes. Seule la période long terme montre une différence significative entre les deux groupes.

3.8. Beta diversité des communautés microbiennes et facteurs d'influence

3.8.1. Les tapis

Les deux facteurs ayant le plus d'impact sur les bêta-diversités des surfaces de tapis sont la ferme, suivie du massif. Les groupes Témoin et Ensemencement ne sont pas directement comparables pour les microbiotes des tapis, car les communautés bactériennes présentaient déjà, à l'état initial, une différence de 6 %.

Concernant les microbiotes des tapis, ce sont donc les dynamiques qui ont été comparées entre les groupes. Le groupe Ensemencement montre une divergence des communautés microbiennes à court terme, suivie d'une convergence à long terme. À l'inverse, le groupe Témoin présente une convergence continue des microbiotes. Il s'est par ailleurs avéré que la divergence observée à court terme était principalement liée aux écarts entre les tapis des exploitations du Beaufortain E76 et E78 (Figure 10).

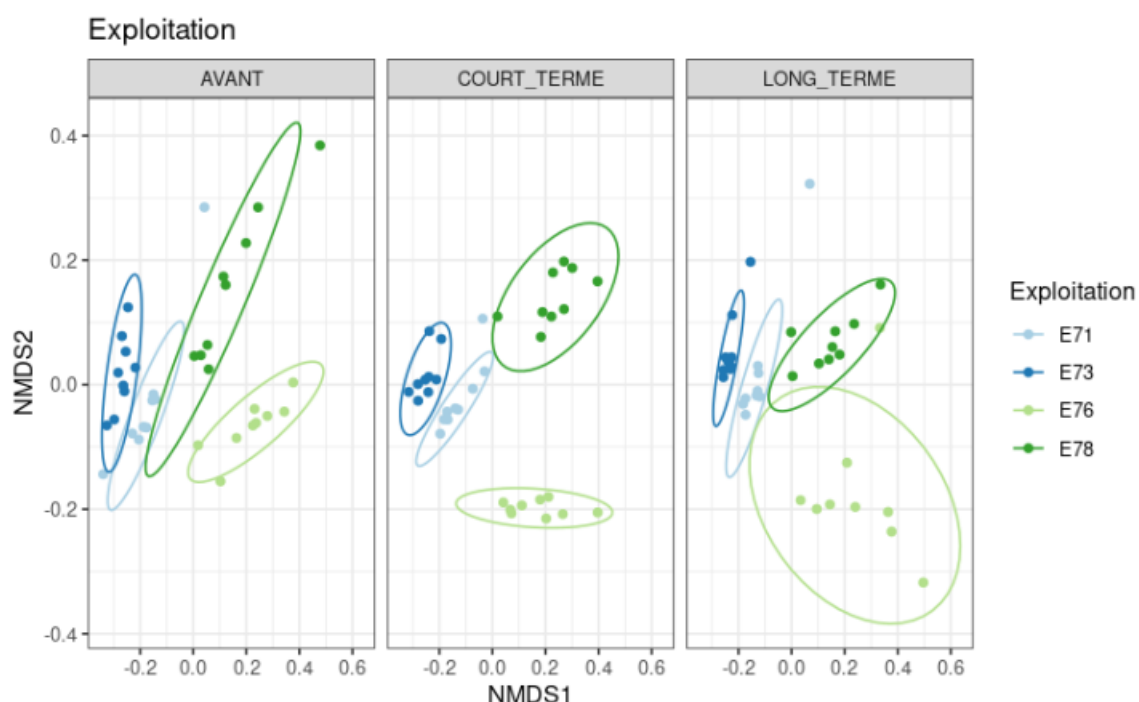


Figure 10 - Communautés microbiennes des tapis ensemencés selon les numéros de ferme et la période. NMDS sur matrice de distance de Bray-Curtis

Des tests différentiels ont été réalisés afin d'identifier les espèces potentiellement associées à ces divergences au cours du temps dans le groupe Ensemencement. *Jeotgalicoccus halophilus* augmente d'un facteur 10 entre l'état initial et le court terme, tandis que *Porphyromonas somerae*, un pathogène animal, diminue d'un facteur 6. Trois bactéries lactiques montrent également une augmentation à court terme : *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus*, *Lapidilactobacillus dextrinicus* et *Ligilactobacillus pobuzihii*. Deux autres bactéries d'intérêt fromager, plutôt associées à l'affinage, augmentent également : *Corynebacterium casei* et *Psychrobacter phenylpyruvicus*.

On observe en parallèle une diminution par un facteur 0,5 de *Corynebacterium bovis* (agent de mammites), ainsi qu'une augmentation par un facteur 2 de *Streptococcus dysgalactiae*, également impliqué dans les mammites.

Enfin, *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus* diminue de nouveau à long terme, d'un facteur 2,33.

3.8.2. Les trayons

Concernant les microbiotes présents à la surface des trayons, les groupes Témoin et Ensemencement se sont révélés comparables dans le massif des Bauges (Figure 11). En revanche, ce n'était pas le cas dans le Beaufortain, où une différence importante de 25 % a été observée (p-value = 0,001).

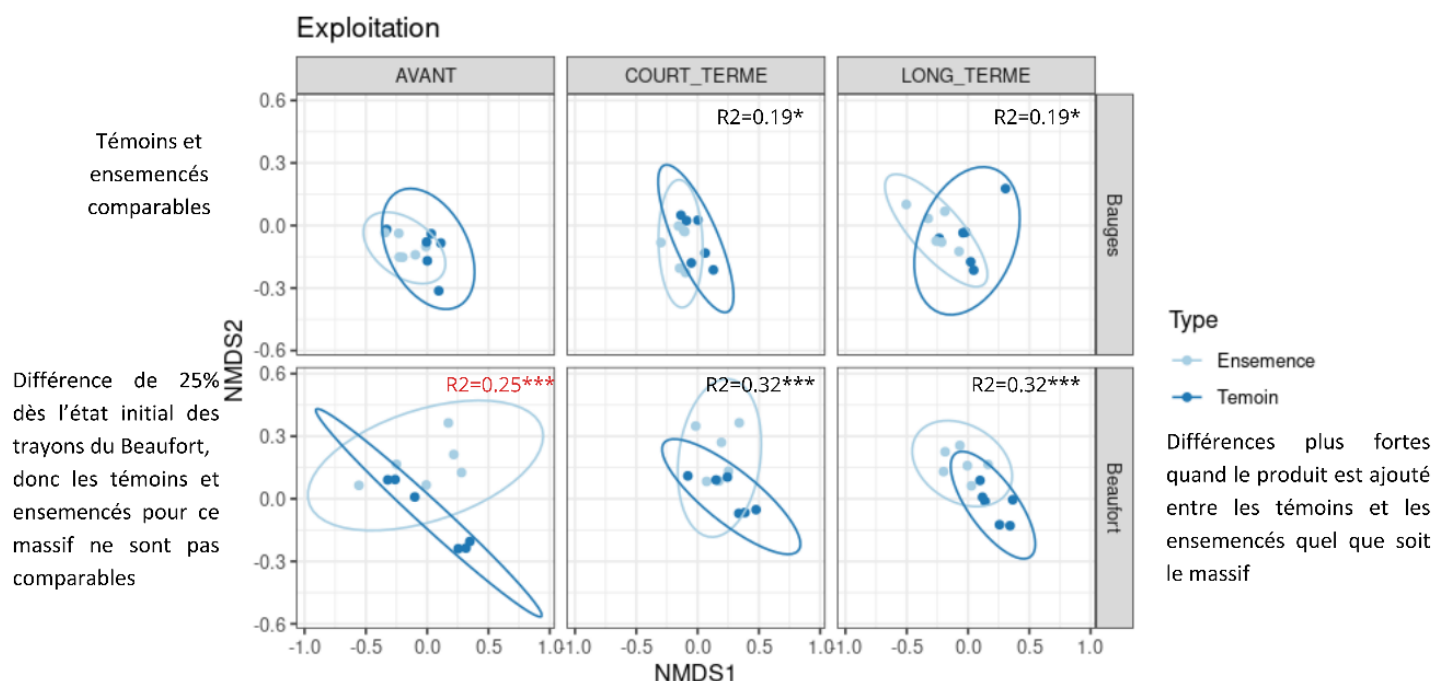


Figure 11 - Communautés microbiennes des trayons, par massif et période, colorées par groupe (E ou T). R^2 : pourcentage de variance expliquée par la PERMANOVA. NMDS sur matrice de distance de Bray–Curtis

Ainsi, les microbiotes des trayons du massif des Bauges ont pu être comparés entre les deux groupes, tandis que pour ceux du Beaufortain, seules les dynamiques au cours du temps ont été analysées par groupe.

Dans le massif des Bauges, il a été observé qu'*Aerococcus* suis, potentiellement pathogène, augmentait à court terme uniquement dans le groupe Ensemencement. *Weissella paramesenteroides*, dont certaines souches possèdent des propriétés anti-*Listeria*, augmentait également à court terme uniquement dans ce groupe (Figure 12). Aucune espèce différentielle n'a été détectée entre le court terme et le long terme pour aucun des deux groupes, ce qui indique une forte stabilité des microbiotes des trayons.

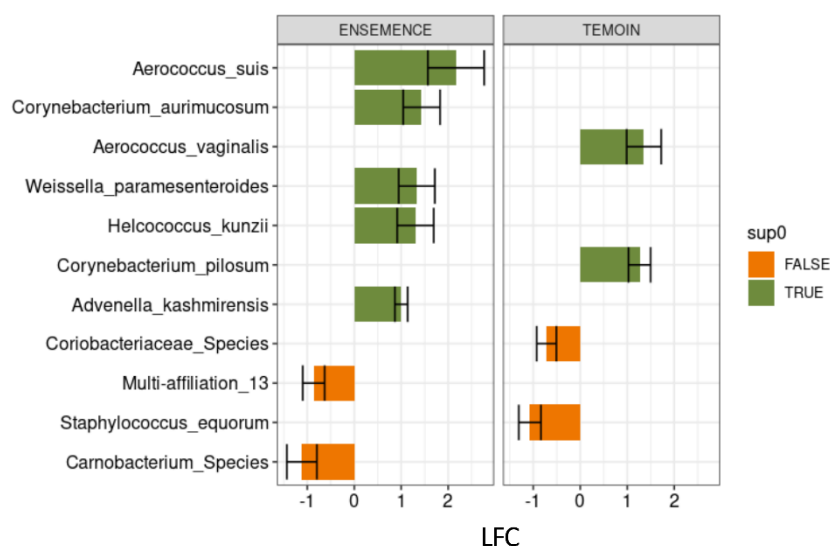


Figure 12 - LogFoldChange du test ANCOMBC concernant les taxons différentiels entre la période initiale et le court terme selon le groupe. Exemple : un taxon coloré en vert augmente à court terme relativement à la période initiale dans le groupe E ; un taxon coloré en orange diminue

Dans le Beaufortain, il est notable que seul le groupe Ensemencement présente une augmentation significative des bactéries lactiques et d'affinage à court terme à la surface des trayons. Parmi les taxons concernés, on retrouve *Ligilactobacillus pobuzihii*, *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus*, *Corynebacterium casei* et *Corynebacterium maris*. Une diminution de deux pathogènes animaux, *Fusobacterium necrophorum* et *Porphyromonas somerae*, est également observée dans ce groupe.

En revanche, dans le groupe Témoin, une augmentation très significative de *Corynebacterium bovis* (agent de mammite) et d'*Aerococcus suis* a été mise en évidence. On note également une diminution de *Pedococcus pentosaceus*, bactérie recherchée en fromagerie pour ses propriétés fortement anti-pathogènes.

3.8.3. Les laits

Les laits présentent des profils microbiologiques comparables entre les deux groupes étudiés, quel que soit le massif. Il est toutefois observé qu'à court terme, les différences de communautés sont plus marquées en Beaufort qu'en Bauges (18 % contre 8 %). De plus, une augmentation significative de la variance intra-groupe est notée dans les laits du groupe Ensemencement (distance au centroïde de 0,47 contre 0,39 pour le groupe Témoin, p-value = 0,04). Cela suggère que, si le produit a eu un effet direct ou indirect, celui-ci a induit une plus grande hétérogénéité des microbiotes lactés au sein d'un même massif (Figure 13).

Dans les laits du massif des Bauges, une augmentation significative d'*Aerococcus suis* est observée à court terme uniquement dans le groupe Ensemencement. Dans le groupe Témoin, une augmentation de *Streptococcus dysgalactiae* — agent de mammite — est observée à court terme, ce qui n'est pas retrouvé dans le groupe Ensemencement.

En Beaufort, un nombre plus important d'espèces différentielles est détecté dans les laits des deux groupes entre les périodes initiale et court terme. Dans les laits enssemencés, *Streptococcus parauberis* (agent de mammite) augmente fortement (facteur 12), de même que *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus*, *Bacillus sp.*, *Lapidilactobacillus dextrinicus* et *Ligilactobacillus pobuzihii*. Dans les laits témoins, une bactérie d'affinage, *Carnobacterium maltaromaticum*, augmente.

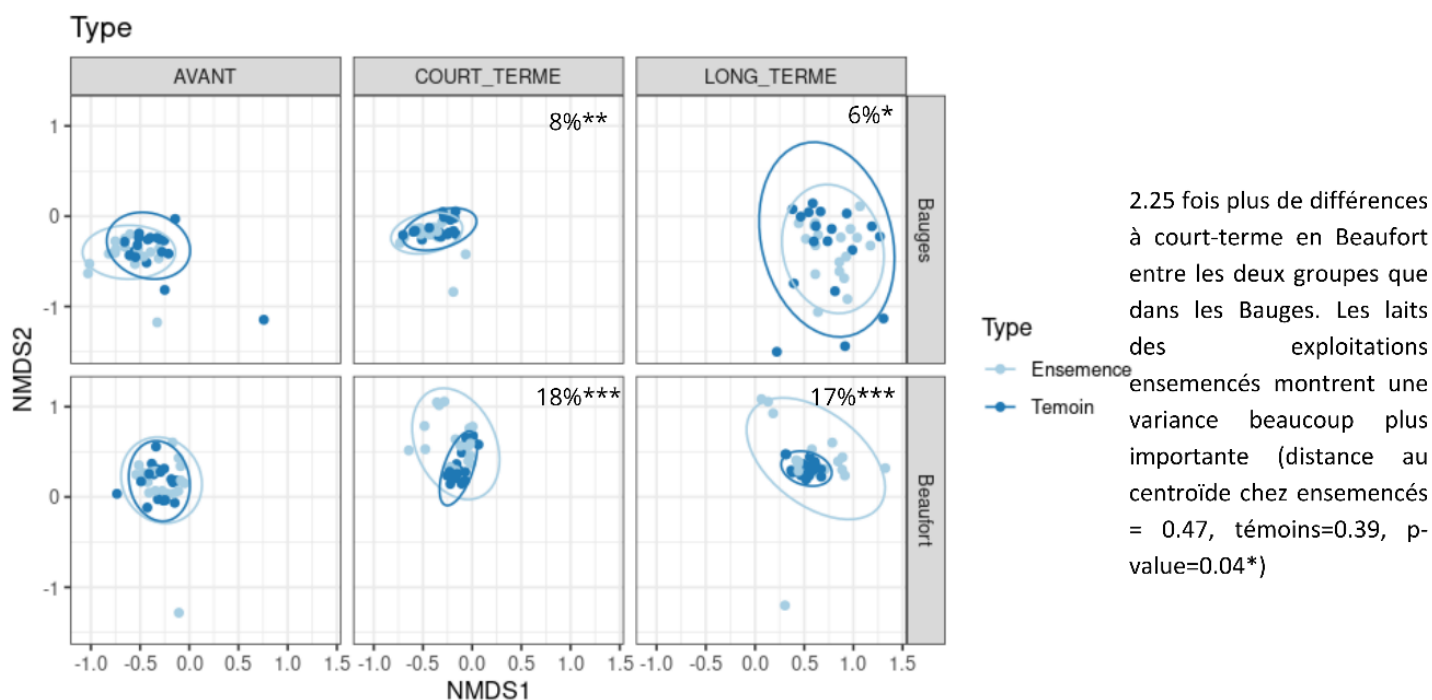


Figure 13 - Communautés microbiennes des laits, par massif et période, colorées par groupe (E ou T). R^2 : pourcentage de variance expliquée par la PERMANOVA. NMDS sur matrice de distance de Bray–Curtis

Un pathogène animal et humain, *Peptoclostridium difficile*, diminue uniquement dans les laits du groupe Ensemencement. De manière générale, un nombre plus élevé d'espèces diminue significativement dans ce groupe, notamment certaines pouvant poser problème en fromagerie, telles que *Clostridium disporicum/saudiense* ou *Psychrobacter* sp.

3.9. Suivis d'espèces différentielles au cours du temps

En Beaufort, plusieurs espèces présentent une augmentation concomitante dans les différents réservoirs, suggérant potentiellement l'existence d'un flux microbien (Figure 14).

Dans le groupe Ensemencement, *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus* augmente significativement au niveau des trayons, et de manière encore plus marquée dans les laits. Ses abondances relatives ne varient pas dans le groupe Témoin. À court terme, *Ligilactobacillus pobuzihii* augmente significativement à la surface des tapis dans le groupe Ensemencement, puis davantage encore sur les trayons, ce qui n'est pas observé dans le groupe T.

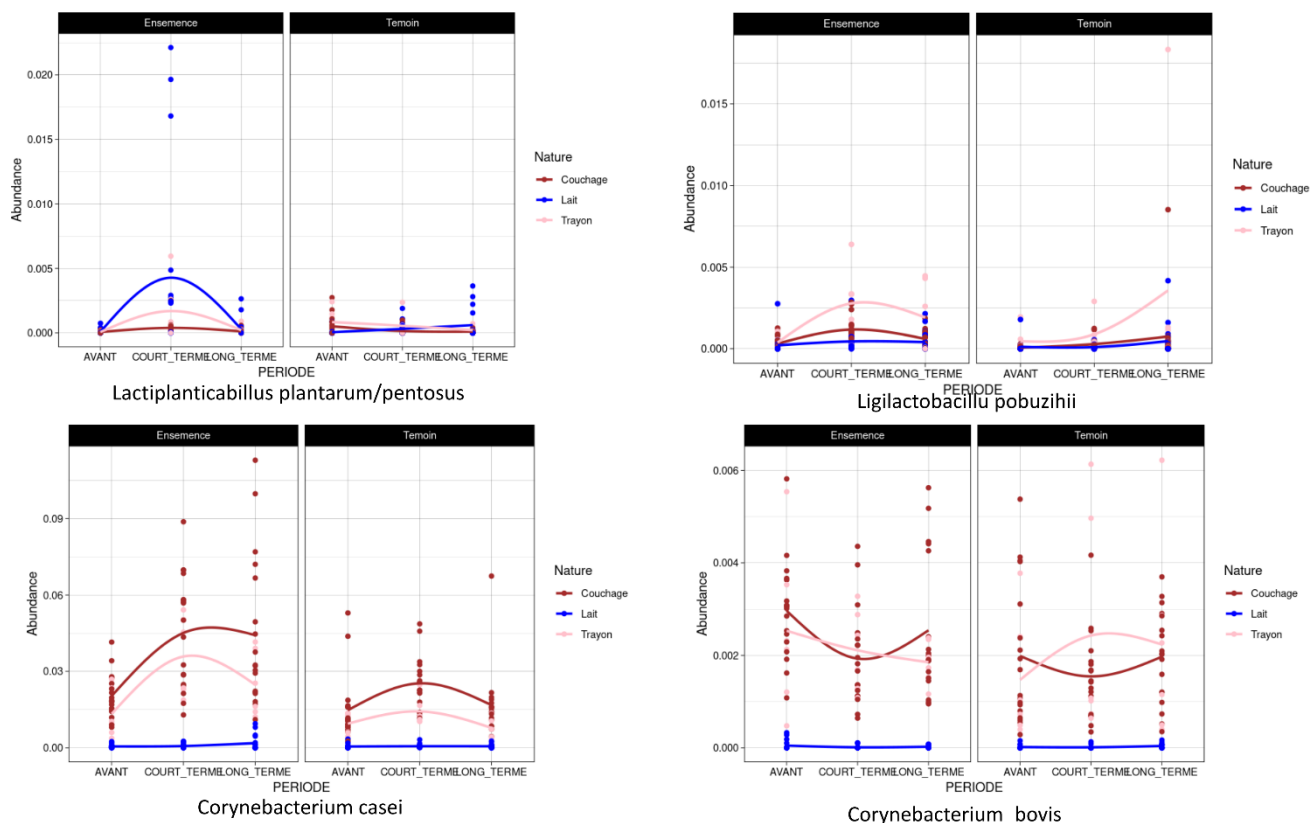


Figure 14 - Suivi des abondances relatives des taxons différentiels selon les périodes, les réservoirs et les groupes. Massif du Beaufortain

Corynebacterium casei augmente dans les deux groupes, mais de façon beaucoup plus prononcée dans le groupe Ensemencement, avec des abondances plus élevées sur les tapis que sur les trayons.

Un agent de mammite, *Corynebacterium bovis*, diminue sur les trayons dans le groupe Ensemencement, alors qu'il augmente dans le groupe Témoin. À court terme, le groupe Ensemencement présente également une diminution plus marquée de cette espèce à la surface des tapis.

Lactilactobacillus dextrinicus augmente significativement dans les laits du groupe Ensemencement (Figure 15), sans que son abondance ne progresse pour autant sur les trayons par rapport au groupe Témoin.

Psychrobacter phenylpyruvicus augmente fortement dans le groupe Ensemencement au niveau des tapis, puis des trayons. Une hausse non significative est observée dans le groupe Témoin à court terme.

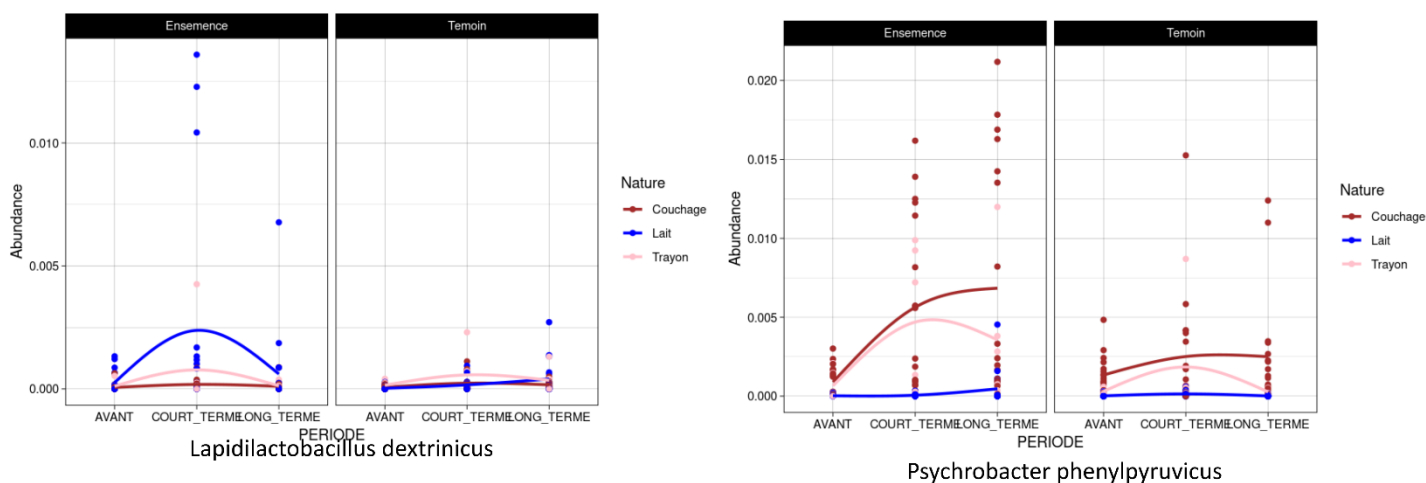


Figure 15 - Suivi des abondances relatives de taxons différentiels selon les périodes, les réservoirs et les groupes. Massif du Beaufortain

Dans les Bauges (Figure 16), peu d'espèces présentent une continuité entre réservoirs, mais ce phénomène a tout de même été observé pour *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Acinetobacter bereziniae* et *Streptococcus dysgalactiae*.

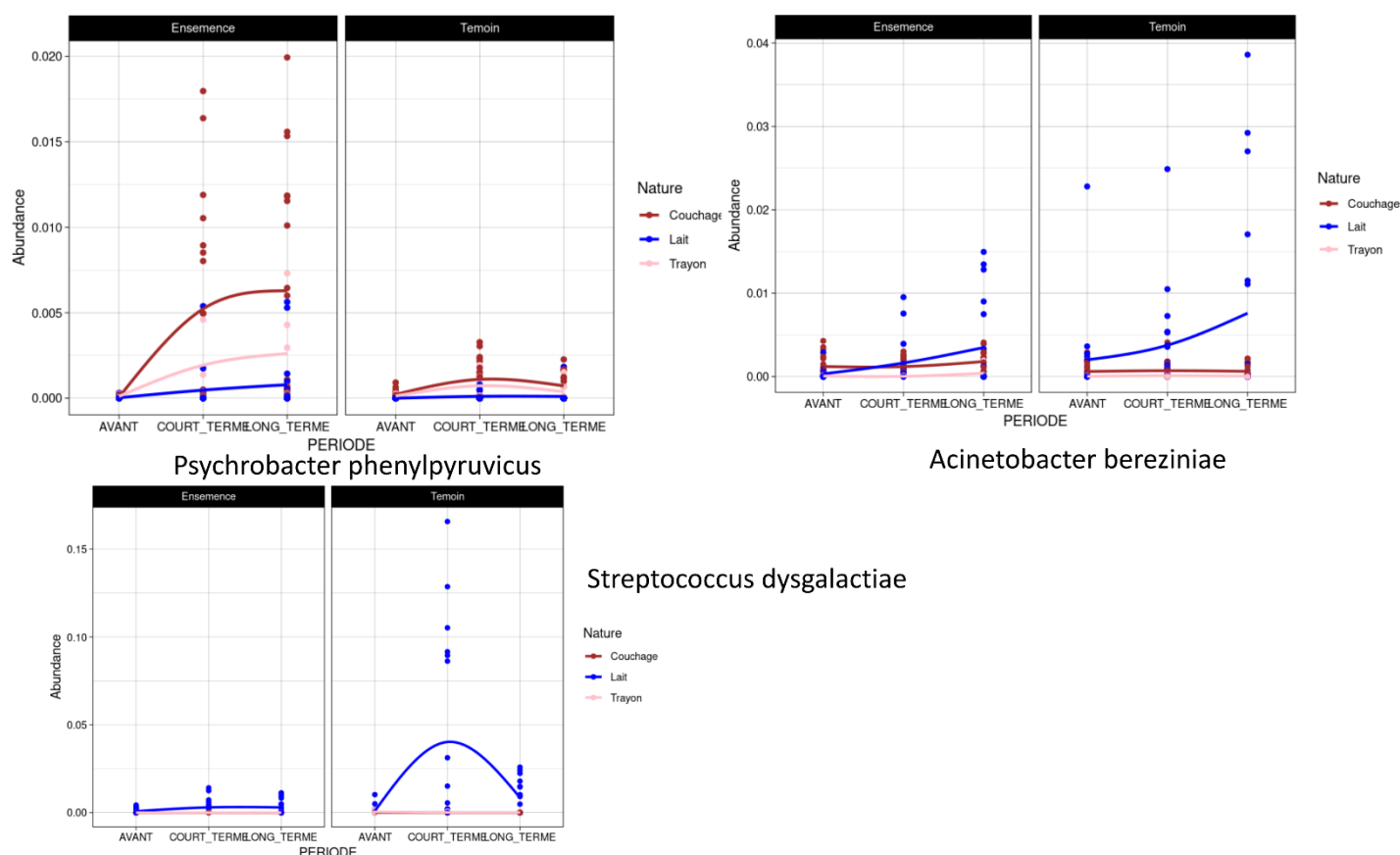


Figure 16 - Suivi des abondances relatives de taxons différentiels selon les périodes, les réservoirs et les groupes. Massif des Bauges

Le groupe Ensemencement montre une augmentation très significative de *Psychrobacter phenylpyruvici* sur les couchages, suivie d'une hausse sur les trayons. Dans les laits, l'augmentation reste seulement tendancielle.

Acinetobacter bereziniae (espèce liée à des défauts fromagers) augmente dans les laits au cours du temps, quel que soit le groupe, mais davantage dans le groupe Témoin.

Streptococcus dysgalactiae, agent de mammite, montre un pic d'abondance à court terme dans le groupe Témoin, sans variation notable ni dans les tapis ni sur les trayons.

3.10. Analyses de réseaux

Les analyses de réseaux de co-occurrence et de co-exclusion ont mis en évidence des particularités dans les réseaux observés à la surface des tapis du groupe ensemencé.

Les réseaux ont pu être construits par ferme et par période, grâce au nombre suffisant de répétitions.

Il ressort que le nombre de liens dans les réseaux du groupe Témoin augmente à court terme, tandis qu'il reste comparable à l'état initial dans le groupe Ensemencement.

Le nombre de liens intermédiaires montre une tendance à la hausse dans le groupe Témoin, alors qu'une tendance à la baisse est observée dans le groupe Ensemencement. La force des corrélations suit une dynamique similaire : elle diminue à court terme dans les réseaux ensemencés, alors qu'elle demeure stable dans les réseaux témoins. Enfin, le nombre de ponts diminue significativement à court terme dans les tapis ensemencés, alors qu'il reste stable dans le groupe Témoin.

Dans l'ensemble, ces indicateurs montrent qu'à court terme, la connectivité du réseau est réduite à la surface des tapis ensemencés par rapport aux tapis témoins.

Il est toutefois important de souligner que, dans toutes les fermesensemencées, *Treponema brennaborense* — un agent de la maladie de Mortellaro — voit sa connectivité diminuer, voire disparaître.

Concernant les réseaux des trayons, une forte diminution des indicateurs de connectivité est observée, en particulier dans le Beaufortain (Figure 17). En Beaufort, la connectivité des trayons diminue à court et à long terme. On note l'émergence, à court terme, d'une *Weissella paramesenteroides* (espèce anti-pathogène) comme taxon connecteur dans le groupe Ensemencement.

À l'inverse, dans les Bauges, la connectivité augmente à court terme dans le groupe Ensemencement, mais sans qu'apparaissent davantage d'espèces connectrices d'intérêt fromager.

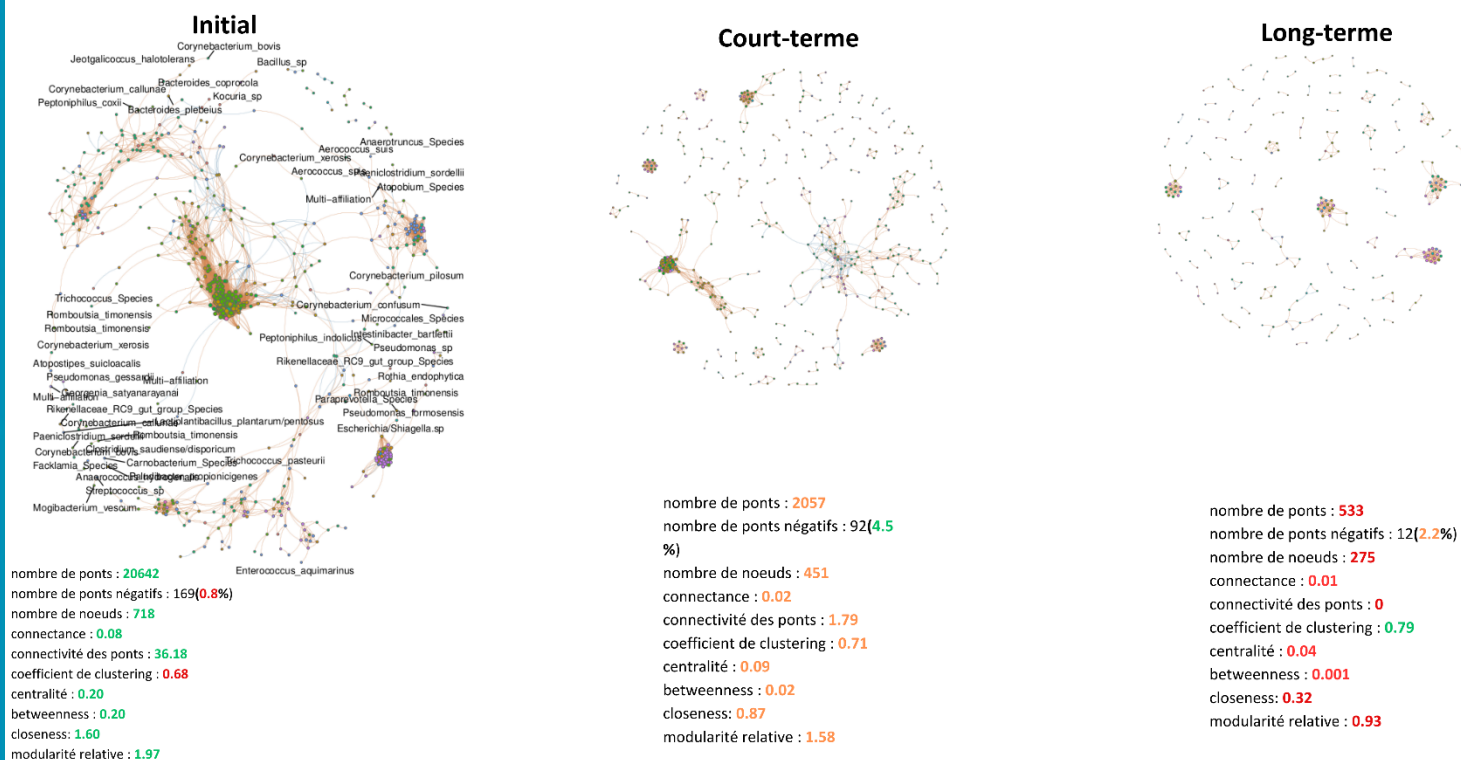


Figure 17 - Réseaux bactériens des trayons du Beaufortain selon les périodes

Le produit n'entraîne pas d'augmentation de l'impact des espèces d'intérêt fromager dans les laits des Bauges, mais il ne perturbe pas non plus négativement leur microbiote.

En Beaufort, les laits ne montrent pas davantage de connexions entre espèces d'intérêt fromager ou acidifiantes/anti-pathogènes à court terme dans le groupe ensemencé.

4. CONCLUSION

Afin de synthétiser l'ensemble des résultats obtenus sur les différents réservoirs et sur les deux massifs étudiés, les points suivants récapitulent les principaux enseignements issus des analyses microbiologiques, physico-chimiques et de réseaux. Ils permettent de dresser un bilan global des effets observés à la suite de l'ensemencement.

POINTS CLES

- **On retrouve *Bacillus subtilis* dans le produit**, ainsi que d'autres espèces telles que *Pseudomonas gessardii*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus cereus-thuringiensis*. D'autres taxons sont détectés en métabarcoding, notamment *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus amylovorus* et *Anaerococcus lactolyticus*.
- **Le groupe ensemencé présente une augmentation des UFC de bactéries lactiques à la surface des tapis**, à court terme et au début du long terme. Cette hausse n'est pas observée dans le groupe témoin.
- **Le pH des tapis diminue très significativement juste après l'application du produit**, avec une baisse d'environ une unité.
- **Cependant, aucune diminution du pH n'est observée à court ou long terme** chez les ensemencés, en comparaison aux témoins.
- **On observe davantage de bactéries d'affinage dans le lait lorsque le produit de post-trempe est du Fortex.**
- **La FMAR du lait est plus abondante lorsque le Fortex ou le HMVir Film sont utilisés.**
- **Concernant la richesse en OTU**, les trayons présentent des valeurs plus élevées à long terme dans le groupe ensemencé que dans le groupe témoin. La diversité de Shannon est plus difficile à interpréter car les différences existent dès l'état initial ; toutefois, on observe une dynamique à la baisse chez les témoins alors qu'elle reste stable chez les ensemencés.
- **En Beaufort, les communautés des tapis ensemencés montrent une divergence à court terme, suivie d'une convergence à long terme.** Cette dynamique n'est pas retrouvée dans le groupe témoin.
- **Les communautés des trayons dans les Bauges sont comparables entre E et T**, car similaires dès l'état initial. Dans le groupe ensemencé, on observe une augmentation d'*Aerococcus suis* (potentiellement pathogène) et de *Weissella paramesenteroides*, une espèce lactique aux propriétés anti-*Listeria* potentielles.
En Beaufort, **les trayons ensemencés montrent une augmentation de diverses bactéries lactiques et une diminution de deux pathogènes bovins**, alors que dans les témoins, **un agent des mammites (*Corynebacterium bovis*) augmente.**
- **Les laits des deux massifs sont globalement comparables entre groupes E et T.**
Dans les Bauges, les laits témoins montrent une augmentation de *Streptococcus dysgalactiae* (agent des mammites), ce qui n'est pas observé chez les ensemencés.
Dans le groupe ensemencé, on observe une hausse de *Clostridium disporicum*, espèce indésirable en fromagerie.
En Beaufort, davantage d'espèces différentielles sont détectées, avec notamment **une diminution de *Peptoclostridium difficile* dans les laits ensemencés**, ainsi qu'une **augmentation d'espèces lactiques d'intérêt.**
- **En Beaufort, on observe entre trayons et laits une augmentation dans le groupe E de *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus* et de *Lapilactobacillus dextrinicus*.**
D'autres espèces augmentent sur les tapis et les trayons ensemencés : *Ligilactobacillus pobuzihii*, *Corynebacterium casei* et *Psychrobacter phenylpyruvicus*.
Le groupe ensemencé montre également **une dynamique à la baisse de *Corynebacterium bovis***, alors qu'elle augmente dans le groupe témoin.

- **Dans les Bauges**, *Psychrobacter phenylpyruvicus* augmente fortement dans les couchages et sur les trayons du groupe E.
Acinetobacter bereziniae, espèce indésirable, montre une hausse plus marquée dans les laits des témoins.
Streptococcus dysgalactiae augmente fortement à court terme dans les laits témoins, ce qui n'est pas observé dans les laitsensemencés.
- **Les indicateurs de connectivité des réseaux bactériens des tapis diffèrent nettement entre groupes.**
Le nombre de connexions augmente à court terme chez les témoins, mais pas chez lesensemencés. Les liens sont également **moins forts** dans le groupe E.
Chez lesensemencés, **lorsque *Treponema brennaborens* (Mortellaro) ou *Treponema porcinum* sont connectrices à l'état initial, elles cessent de l'être à court terme**, ce qui pourrait refléter un effet du produit.
À l'inverse, dans les témoins, ces espèces peuvent devenir connectrices à court terme.
- **Une perte de connectivité est observée sur les trayons en Beaufort**, avec l'apparition dans le réseau de *Weissella paramesenteroides*, espèce à potentiel anti-pathogène.
Dans les Bauges, on n'observe pas d'augmentation du poids des espèces d'intérêt à court terme.
- **Dans les laits**, aucune diminution de connectivité à court terme n'est observée, et aucune maximisation du poids des espèces d'intérêt dans les réseaux n'est mise en évidence.

CONCLUSION GENERALE

Dans l'ensemble, l'ensemencement induit des effets principalement transitoires et localisés, davantage marqués en Beaufort qu'en Bauges. Certains signaux apparaissent favorables (réduction de pathogènes, hausse ponctuelle d'espèces lactiques, diminution du rôle structurant de *Treponema* sur les tapis), tandis que d'autres éléments restent neutres ou parfois défavorables (hausse de taxons indésirables dans certains laits).

Aucun impact négatif majeur n'est observé sur les laits, et les effets sur les communautés d'intérêt fromager demeurent limités. Ces résultats soulignent l'importance des contextes d'exploitation et de massif dans la réponse à l'ensemencement, et indiquent que les impacts potentiels du produit restent modulés et variables selon les réservoirs étudiés.

5. BIBLIOGRAPHIE

Catherine Denis, Micheline Gueguen, Eric Henry and Delphine Levert. New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait*, 81 3 (2001) 365-379. DOI: <https://doi.org/10.1051/lait:2001138>

Verdier-Metz I, Delbès C, Bouchon M, Rifa E, Theil S, Chaucheyras-Durand F, Chevaux E, Dunière L, Chassard C. Dietary Live Yeast Supplementation Influence on Cow's Milk, Teat and Bedding Microbiota in a Grass-Diet Dairy System. *Microorganisms*. 2023 Mar 6;11(3):673. doi: 10.3390/microorganisms11030673. PMID: 36985246; PMCID: PMC10053648.

6. ANNEXES

Données complémentaires – rapport Julia Bondat

GROUPE
isara-isema

Isara
Agrapole – 23, rue Jean Baldassini
69364 LYON cedex 07

CERAQ
Centre de
ressources pour
l'agriculture de qualité
et de montagne

CERAQ
Maison de l'agriculture et de la forêt
40 rue du Terraillet,
73190 Saint Baldoph

Données complémentaires

Etude de l'impact d'un produit d'ensemencement des litières sur les écosystèmes
microbiens



Personnelle, 2024

**PROJET
LITIÈRES**

Document supplémentaire, joint au Mémoire de fin d'études

Directeur du mémoire :
POLTURAT Blandine
Coordinatrice de l'Axe Savoir Faire et Produits

Tuteur pédagogique :
DEMARIGNY Yann

BONDAT Julia

Élève ingénieur Isara
Promotion 52

Date de soutenance :
04/07/2024

Sommaire

Sommaire **Erreur ! Signet non défini.**

Partie 1 : Matériels et méthodes 29

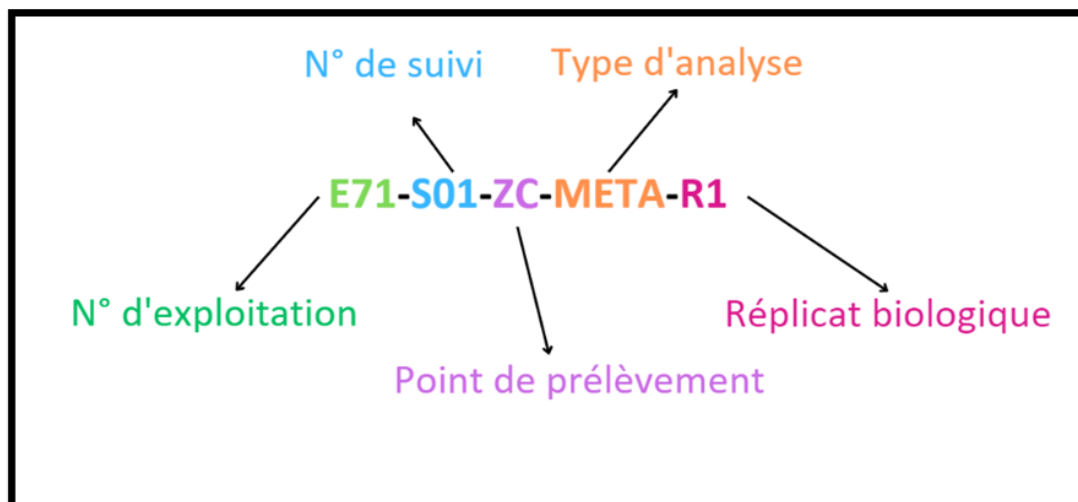
1. Nomenclature des échantillons 29
2. Procédure de prélèvements 30
 - A. Procédure pour le prélèvement de microflores à la surface de la zone de couchage avec une pédichiffonnette 31
 - B. Procédure pour le prélèvement de flores sur à la surface des trayons 33
 - C. Procédure pour le prélèvement de lait dans le tank 35
3. Guide d'entretien 37
4. Fiche des notations et d'observations 48

Partie 2 : Résultats 55

1. Contextualisation des données 55
 - ❖ Critères généraux 56
 - ❖ Etat du bâtiment et âge des tapis 58
 - ❖ Pratique de raclage 59
 - ❖ Sanitaire 60
 - ❖ Alimentation et eau 60
2. Effet du produit d'ensemencement sur d'autres paramètres : pH de la zone de couchage et propreté des vaches 61
 - ❖ pH à la surface des tapis 61
 - ❖ Propreté des vaches selon le moment de notation 64

Partie 1 : Matériels et méthodes

Nomenclature des échantillons



Type d'analyse		
Abréviation	Nom complet	Description
META	Métabarcoding ADN 16S (Uniquement en Savoie)	<ul style="list-style-type: none">• Préparation des culots cellulaires• Congélation des culots• Envoi des culots à l'UMRF (extraction de l'ADN)• Séquençage au Génotoul
PAST	Pasteurienne	<ul style="list-style-type: none">• Flore totale (FMAR)• Flore lactique mésophile• Flore d'affinage• Bacillus (sans thermochocage)• Bacillus (avec thermochocage)
qPCR	Échantillon spécifique en vue d'éventuelles qPCR (uniquement dans le Massif Central)	
SECU	Échantillon de sécurité	Destiné à la congélation Utiliser en cas de problème

Points de prélèvement	
Abréviation	Nom complet
ZC	Zone de couchage
TR	Trayons
LA	Lait

Figure 18 : Nomenclature utilisée pour les échantillons

Procédure de prélèvements

Les procédures ont été rédigés dans le cadre des prélèvements de microbiotes destinées aux analyses pasteuriennes mais aussi pour les analyses Métabarcoding ADN 16S simultanément ; c'est pourquoi avec la liste du matériel décrit il est possible de prélever plusieurs échantillons. Le tableau 1, ci-dessous, présente le nombre d'échantillons récupérés par ferme.

	Zone de couchage	Surface des trayons	Lait cru
Analyses pasteuriennes	Les analyses pasteuriennes seront effectuées à partir d'un échantillon destiné au métabarcoding ADN 16S	1 échantillons (composée de 10 lignettes)	1 échantillon (flacon de 60mL)
Analyses Métabarcoding ADN 16S	3 échantillons (composés chacun d'une pédichiffonnettes)		3 échantillons (composés chacun d'un flacon de 180mL)
Sécurité	0	0	1 échantillon (flacon de 180mL)

Tableau 4 : Nombre d'échantillons prélevés par fermes (en fonction des analyses et des points de prélèvements)

Procédure pour le prélèvement de microflores à la surface de la zone de couchage avec une pédichiffonnette

Matériel à avoir dans la caisse :

- 2 kits stériles, contenant :
 - une paire de surbotte,
 - un sac stomacher,
 - une paire de gants stérile
 - 2 pédichiffonnettes
- 3 sacs stomacher stériles refermables (possible de réutiliser ceux des kits s'ils sont manipulés et conserver gardés de manière stérile)
- Alcool à 70°C + spray et/ou lingette désinfectantes pour les surfaces
- Boîte de gants à usage unique
- 1 botte lestée avec une corde ainsi qu'un socle adéquat
- 1 paire de surbottes pour l'opérateur
- 2 caisses en plastique avec couvercle (l'une servira à stocker et déplacer le matériel, et l'autre servira à déballer les kits stérile)
- Gel hydroalcoolique
- Table de camping
- Sac poubelle
- Glacière avec des blocs de froid
- Feutre indélébile



Avant le prélèvement :

- Préparer une caisse avec tout le matériel dedans
- Enlever ses bijoux au mains et poignets
- Enfiler les surbottes aux deux pieds (du préleveur) avant d'entrer dans le bâtiment
- Installer la table de camping dans le bâtiment d'élevage (dans un endroit facile d'accès, propre et qui ne gêne pas les agriculteurs), mettre le socle de la botte à proximité de la table et ouvrir un sac poubelle.
- Poser les deux caisses en plastique sur la table
- Se désinfecter les mains au gel hydroalcoolique
- Installer la botte lestée sur le socle et désinfecter la botte à l'alcool et attendre qu'il s'évapore ou avec une lingette désinfectante
- Sécurisation du prélèvement
 - Demander à l'éleveur d'être présent lorsque vous êtes amené à prélever à côté des animaux afin qu'il confirme qu'il n'y a pas de risque ou qu'il sécurise la zone si nécessaire.

Prélèvements :

- Ouvrir la caisse en plastique contenant le matériel
- Ouvrir la seconde caisse en plastique et désinfecter l'intérieur avec une lingette désinfectante (ou alcool à 70°C) pour la rendre stérile
- Mettre une paire de gants à usage unique (stérile)
- Déballez le(s) kit(s) stérile(s) dans la caisse stérile, en veillant à ne pas toucher le contenu à l'intérieur avec vos gants
- Changer de paires de gants (pour des stériles) [jeter ceux qui viennent d'être utilisés dans le sac poubelle]
- Enfiler la surbotte sur la botte lestée
- Changer de paires de gants (pour des stériles)
- Ouvrir le sac stomacher du kit ; et récupérer une pédichiffonnette ; puis refermer légèrement le sac (le laisser dans la caisse stérile)
- Enfiler la pédichiffonnette sur la botte

- Penser à refermer la boîte en plastique stérile
- Enlever la botte du socle sans toucher la pédichiffonnette (conseil : tenir la corde)
- Effectuer **40 pas** avec la chaussette de prélèvement sur les logettes :
 - Avec un maximum de 4 pas par logette
 - Uniquement sur le tiers arrière de la logette (à l'entrée de la logette, où se trouvent les mamelles)
 - Réaliser les pas sur 10 logettes différentes au minimum
- Veiller à :
 - Marquer 2 secondes par pas du pied de prélèvement, garder le même rythme pour tous les prélèvements – ne pas appuyer, ne pas laisser tomber : juste poser délicatement à la surface
 - Ne pas marcher sur les bouses, les flaques, ... (toutes zones atypiques non représentatives de la globalité de la litière)
 - Éviter de toucher toute autres infrastructures (mur, barrière, ...) avec la botte et éviter qu'une vache touche la botte (coup de queue, reniflement, coups de pattes...)
- Revenir près du socle
- Installer la botte sur le socle, en veillant à ne pas toucher la pédichiffonnette. (Conseil : tenir la corde au début, prendre la botte à l'avant sur le mortier et à l'arrière sur la plastique, retourner la botte en lâchant la corde, l'installer sur le socle)
- Changer de paires de gants (pour des stériles)
- Ouvrir un sac stomacher
- Changer de paires de gants (pour des stériles)
- Retirer la pédichiffonnette (conseil : la retourner à l'envers) et la mettre dans le sac stomacher
 - Possibilité de tenir le sac dans une main, et dans l'autre qui contient la pédichiffonnette éviter de toucher l'extérieur du sac
- Sceller le sac en veillant à évacuer l'air au maximum
- Nommer l'échantillon selon la nomenclature prévue (avec le feutre indélébile)
 - Exemple : « **E71-S01-ZC-META-R1** » correspond à Exploitation 71, Suivi 1, Zone de couchage, Métabarcoding ADN 16S et réplicat biologique 1
- Déposer l'échantillon dans la glacière (ou dans la caisse en attendant de les mettre dans la glacière si elle est restée en dehors de la stabulation)
- Enlever la surbotte de la botte et les gants (les mettre à la poubelle)
- Se désinfecter la main au gel hydroalcoolique
- Répéter l'opération depuis le début

Bien vérifier que les échantillons soient tous nommés dans la glacière.

Conseil : A la fin de ces prélèvements, en profiter pour compléter la grille de notation (état de propreté) et faire les mesures physico-chimiques. (Cela permet d'avoir toujours les mêmes surbottes aux pieds du préleveur).

Entre chaque ferme penser à bien désinfecter tout le matériel en contact de la stabulation (table de camping, socle de la botte...).

Procédure pour le prélèvement de flores sur à la surface des trayons

Matériel :

- 10 lingettes imprégnées (conditionnement : 1 sac de 20 lingettes stériles une à une)
- 1 sac stomacher stérile
- 1 sac zip de 10 gants (à usage unique) préalablement préparés de façon qu'ils soient toujours stériles) + 1 boîte de gants à usage unique de prélèvements en cas de besoin
- Glacière avec des blocs de froids
- Gilet cargo (et sacoche 3L accrochable au gilet cargo)
- Gel hydroalcoolique
- Surbotte (si l'opérateur arrive dans la ferme et qu'il n'en a pas déjà)
- Feutre indélébile



Avant le prélèvement :

- Enfiler des surbottes
- Enfiler le gilet cargo et accrocher la sacoche 3L dessus
- Mettre le sac de gants (préalablement préparés et stériles) dans une des poches du gilet cargo. Ne pas l'ouvrir
- Mettre le sac stomacher stérile dans une autre poche (facilement accessible) du gilet cargo. Ne pas l'ouvrir
- Se désinfecter les mains au gel hydroalcoolique
- Se positionner dans un endroit "propre"
- Ouvrir le sac qui contient les 20 lingettes
- Mettre une paire de gants à usage unique stériles (si incertitude sur leur stérilité, possible de les enfiler puis les désinfecter au gel hydroalcoolique)
- Ouvrir un sachet contenant 1 lingette le poser (bien ouvert) dans un endroit propre en veillant à ce que rien ne touche l'ouverture du sachet et en veillant aussi à ne rien toucher d'autres avec ses gants.
- Prendre un autre sachet avec une lingette, l'ouvrir.
- Récupérer la lingette (toujours les gants stériles) et la déposer (un peu froissée) dans le sachet déjà ouvert (en évitant de toucher quoique ce soit). Répéter cette étape 9 fois afin d'avoir 10 lingettes dans le même sachet. Fermer en enroulant le haut du sachet.
- Déposer ce sachet "fermé" dans la sacoche accrochée au gilet cargo et fermer la sacoche (pour éviter les contamination extérieures)
- Jeter ses gants

Prélèvement :

- Vérifier l'état des trayons des vaches pour avoir une idée de la propreté moyenne
- Ouvrir le sac de gants et le sac stomacher présent dans les poches du gilet cargo, en veillant à ne pas contaminer l'intérieur. Ouvrir aussi la sacoche
- Enfiler une paire de gants propres et stériles.
- Avec une main ouvrir (déroulé) le sachet contenant les lingettes
- Avec l'autre main (qui sera gardée toujours de façon stérile), prendre une lingette (en veillant à ne pas toucher l'extérieur du sachet.
- Avec la lingette, faire le prélèvement sur les trayons d'une vache
 - 1 lingette par vache
 - 1 lingette pour 2 trayons de la même vache
 - Prélever **avant** le nettoyage ou la désinfection du trayon par l'éleveur
 - Prélever au total 10 vaches au fil de la traite, par série d'environ 2-3 vaches par quai. Faire au minimum 4 vagues de vache (quai) différentes

Prélever 2 trayons par animal et par lingette, en prenant soin de « **croiser** » pour les vaches (un trayon avant/arrière et droit/gauche de manière à prendre en compte l'hétérogénéité de salissure des 4 trayons d'un même animal).

Frotter la partie du trayon en contact avec le manchon trayeur en n'oubliant pas l'extrémité du sphincter. Frottement de haut vers le bas du trayon avec la lingette – mouvement répété 5 fois et qui dure 2 secondes, et passer aussi sur le sphincter (bout du trayon)

Veiller à :

- Ne pas prendre les vaches avec un trayon particulier (malade, blessé, mammite, atrophié...). Pour cela demander à l'éleveur de nous prévenir des vaches qui faut éviter
- Éviter tous trayons atypiques non représentatifs de la globalité du troupeau (éviter les vaches qui ont beaucoup de bouses ou de saletés sur les trayons...)
- Si une vache donne un coup de queue ou coup de patte dans la lingette, jeter la lingette. Jeter aussi la lingette si elle touche un autre support dans la salle de traite.
- Mettre les lingettes au fur et à mesure dans les sacs (en veillant à pas toucher l'extérieur du sac ou autres éléments)
- Changer de gants entre chaque **vague** (quai) de vaches

Rq : possible d'avoir un gant "sale" qui sert à mettre tenir l'extérieur des sacs et un gant "propre" qui touche les lingettes (mais attention à ne pas inverser pendant le prélèvement)

Après le prélèvement :

- Veiller à bien refermer le sac stomacher en éliminant le plus possible d'air.
- Nommer les sacs (au feutre indélébile), selon la nomenclature prévue
Ex. : « **E71-S02-TR-META** » pour Exploitation 71, Suivi 2, Trayon, Métabarcoding ADN 16S
- Placer les échantillons contenant les lingettes dans une glacière

Bien vérifier que les échantillons soient tous nommés dans la glacière

Source : Réseau Fromages de Terroirs, 2011. Fiche Procédure. Prélèvement de flores de surfaces des trayons. Thème : Gestion des écosystèmes microbiens des laits et des fromages. 3 janvier 2011. 4 Pages

Procédure pour le prélèvement de lait cru dans le tank

Matériel :

- Gants à usage unique
- Louche en inox avec un manche assez grand (environ 1 mètre)
- Alcool à 70°C et spray
- 4 flacons en plastiques à usage unique stériles de 180mL
- 1 flacons en plastiques à usage unique stériles de 60mL
- Marqueur indélébile
- Papier essuie tout propre
- Glacière avec des blocs de froid (ou avec idéalement avec de la glace pilée car elle permet un meilleur refroidissement des échantillons)
- Fiche de suivi des prélèvements (date, heure, problèmes rencontrés lors du prélèvement, ...) + stylo/crayon
- Surbottes
- Sac zip (facultatif)



Remarques : attention de ne pas prélever avec les flacons du contrôle laitier qui contiennent du bronopol.

Avant le prélèvement :

- Enfiler des surbottes si l'opérateur n'en a pas
- Nommer les flacons plastiques stériles avec un marqueur, selon la nomenclature prévue.
Exemple : « **E75-S01-LA-PAST** » correspond Exploitation 75, Suivi 1, Lait, Pasteurienne
- Nettoyer la louche à l'alcool à 70°C. Patienter quelques instants (pour laisser agir) et essuyer le restant d'alcool avec du papier essuie-tout propre

Au moment du prélèvement :

- Homogénéiser le lait pendant 5 minutes (demander à l'éleveur de mettre en marche l'agitation du tank si besoin)
- Ouvrir un flacon stérile (déposer le couvercle du flacon à l'envers et dans un endroit propre, sans risque de contamination (par exemple dans un sac zip))
- Prélever le lait avec la louche dans le tank directement par le « trou d'homme ». Eviter de toucher les parois du tank et l'agitateur avec la louche
- Verser le contenu de la louche dans le flacon stérile. Répéter l'opération jusqu'à obtenir le volume souhaité dans le flacon et fermer rapidement le flacon.
- Renouveler l'opération avec les flacons suivants.
- Vérifier que les flacons soient bien fermés
- Mettre les flacons dans la glacière (surtout si le lait a été prélevé chaud) pour les transporter jusqu'au laboratoire à une température entre 0 et 4 °C.
- Nettoyer la louche
- Relever les observations sur la fiche de suivi des prélèvements

Cas particulier des prélèvements effectués chez des producteurs fermiers

- Prélever avant que le lait soit poussé à la fromagerie si il y a un tank
- « Attention à ne pas prélever du laitensemencé, notamment si le lait de la traite du soir est mis en l'éleveur prématuration ; dans ce cas, ne prélever que le lait de la traite du soir avant ensemencement, sauf si accepte de changer ses pratiques.

Attention aussi à ceux quiensemencent avant la traite : faire décaler l'ensemencement, ce qui aura des conséquences sur la fabrication (décalage de l'heure d'emprésurage, ...) » (Réseau Fromages de Terroirs, 2009).

En conséquence, si c'est un producteur fermier, faire les prélèvements le soir en fin de journée (pour avoir la traite du soir et que le lait reste dans le tank, sans ensemencement).

Source : Réseau Fromages de Terroirs, 2009. Fiche Procédure. Prélèvement stérile du lait. Thème : Gestion des écosystèmes microbiens des laits et des fromages. Décembre 2009. 2 Pages.

Guide d'entretien

L'objectif de cet entretien est de contextualiser les données que nous récolterons par la suite (*Autrement dit, cet entretien nous permettra de prendre en compte le contexte de la ferme lors des analyses et de l'interprétation des résultats*).

Ce questionnaire se déroule en 7 parties :

1. Vérifications
2. Généralités
3. Gestion de la litière
4. Pratiques de traite
5. Bâtiments
6. Alimentation
7. Sanitaire

L'ensemble de cet entretien restera confidentiel, les données seront anonymisées grâce à un identifiant codé.

Date de l'entretien : ____/____/____

Nom de l'enquêteur : ____

Identifiant : E____

Nom de l'exploitation : _____

Nom : _____

Prénom : _____

Adresse : _____

Département : Savoie / Haute-Savoie / Cantal

Coordonnées GPS : _____

Téléphone : _____

Mail : _____

A entourer : Témoin / Ensemencement

PARTIE 1 : VÉRIFICATIONS

Avez-vous déjà utilisé un asséchant sur la litière des vaches ? OUI / NON

Si oui, quel est le type d'asséchant ? _____

Nom commercial : _____

Est ce qu'il vous reste une étiquette ou fiche technique ? (Possible de la récupérer / photographier ?)

A quand remonte la dernière utilisation ? _____

A quelle fréquence l'utilisiez-vous ? _____

En quelle quantité l'utilisiez-vous ? _____

Quel mode d'application ? _____

Pour quel motif l'utilisiez-vous ? _____

Avez-vous déjà utilisé de la litière (farine de paille, sciure...) sur les logettes tapis ? OUI / NON

Si oui, quel est le type de litière ? _____

A quand remonte la dernière utilisation ? _____

A quelle fréquence l'utilisiez-vous ? _____

En quelle quantité l'utilisiez-vous ? _____

Quel mode d'application ? _____

Pour quel motif l'utilisiez-vous ? _____

PARTIE 2 : GENERALITES

Pouvez-vous présenter l'exploitation ?

Personnel sur l'exploitation,

Nombre de personnes travaillant sur l'exploitation :

Associé(e,s) : _____

Salarié(e,s) : _____

Autre(s) : _____

=> UTH :

Assolements

Surface SAU :

- Types de cultures sur l'exploitation : _____
- Types de prairies : _____

Race : _____ Tarines : _____ Montbéliardes : _____ Abondance : _____ Autres : _____

Nombre de **vaches laitières** en moyenne sur l'année : _____ VL

Nombre génisses total : _____

Combien y a-t-il **d'UGB** en moyenne sur l'année ? _____ UGB

→ Si les éleveurs ont du mal à répondre sur un chiffre précis, demander les effectifs par classe d'âge.
Une conversion pourra être effectuée dans un second temps.

Génisses > 3 ans : _____

Génisses > 2 ans: _____

Calcul UGB : _____

Génisses 1-2 ans: _____

Génisses < 1 an: _____

Taureaux: _____

Quantité de lait produite par an : _____ L / an

Êtes-vous **producteur** : _____ fermier / laitier

- Si laitier, à qui livrez-vous le lait ? _____
Lait cru ou pasteurisé

Adhères-vous au contrôle laitier ? OUI NON

- Si fermier, quantité transformée à la ferme : _____ L / an

Quel est le devenir du lait après la traite ? Tank / Cuve / Autres :

Y-a-t-il un report de lait dans le tank ? OUI / JAMAIS

Si oui, :

- lait du matin avec un reste du lait de la traite de la veille
Proportion : _____ L de lait matin _____ L de lait soir

ou

- lait du soir avec un reste du lait de la traite du matin même
Proportion : _____ L de lait matin _____ L de lait soir

Si producteur fermier et que le lait va directement dans la cuve ; à quel moment sont ajoutés les ferments ? _____

SIQO

- Abondance / Beaufort / Tome des Bauges / Emmental / Gruyère / Raclette / Tomme de Savoie / Reblochon / _____
- Cantal / Fourme d'Ambert / Fourme de Montbrison / Laguiole / Salers / Saint-Nectaire / _____
- Bio
- Label rouge
- Autres :

Durant quels mois les vaches passent-elles la nuit à l'étable ?

Ja n	Fé v.	Ma rs	A v.	M ai	Jui n	Jui l.	Ao ût	Sep t.	Oc t.	No v.	Dé c.

Période habituelle de rentrée des vaches : entre le _____ et le _____

Date de sortie des vaches : entre le _____ et le _____

PARTIE 3 : GESTION DE LA LITIÈRE

LOGETTES

Combien y a-t-il de logettes (nombre de places de couchage) ? _____

- Possible de les voir à la fin de cet entretien ?
- Est-ce que certaines ont des particularités ? (schéma)

Type de logette : Tapis / Matelas

Etat du tapis/matelas : neuf, bon état usé abimé - à changer

Âge des tapis :

comment ils sont fixé au sol -Fixation au sol :

Avec quel outil raclez-vous les logettes ? (manuel ou autre) : _____

Est-il spécifique aux logettes ou est-il utilisé ailleurs dans les logettes :

SPÉCIFIQUE / NON SPÉCIFIQUE

(peut expliquer flux de flore dans bâtiment)

À quelle fréquence raclez-vous les logettes ?

Tous les jours : OUI / NON

Nb de fois par jour : _____

A quel(s) moment(s) de la journée ? (A quelle heure raclez-vous ?) _____

COULOIRS DE CIRCULATION DES VACHES

Nature du sol dans les couloirs ? SOL PLEIN / SOL RAINURE

Avec quel outil raclez-vous les couloirs ? → manuel, racleur, robot racleur / robot aspirateur, tracteur) :

_____ A quelle fréquence raclez-vous les couloirs ?

Automatique : OUI / NON

Existe-t-il des zones non racées avec accumulation de bouses (vers les abreuvoirs, les couloirs transversaux, angle,...) ? _____

Fosse à lisier sous le bâtiment avec caillebotis ? OUI / NON

Appliquez-vous des produits sur les caillebotis ? (ex : activateur de flore dans la fosse / améliorateur de lisier) : OUI / NON

Si oui lesquels ? _____

A quelle fréquence ? _____

PARTIE 4 : PRATIQUE DE TRAITE

Quel est le nombre de vaches laitières qui se font traire en hiver ? _____

Combien de personnes sont présentes à la traite ?

Le matin : _____

Le soir : _____

A quelle heure à lieu la traite du matin ? Début : ____h____ Fin : ____h____

A quelle heure à lieu la traite du soir ? Début : ____h____ Fin : ____h____

Combien y a-t-il de quai dans la salle de traite ? 1 ou 2

Combien y a-t-il de vache par quai de traite ? _____

Quelle est l'organisation entre les trayeurs lors d'une même traite ?

- Chaque trayeur s'occupe d'un quai
- Les trayeurs s'occupent du même quai mais avec des actions spécifiques → lesquelles ? : _____
- Autres : _____

Décrochage automatique ? OUI / NON

Avant la traite

Nettoyez-vous trayons ? Jamais Parfois Toujours

Comment nettoyez-vous les trayons ?

- Voie humide : Lavette individuelle / Lavette collective / Papier / Douchette / Eau seule / Eau + savon / Eau + savon désinfectant / Autres :
- Voie sèche (Essuyage) : Papier / Lavette sèche / Laine de bois / Autres :

Pré- trempage : OUI / NON

Si oui :

- type produit : _____
- nom du produit : _____
- Composition : _____

Elimination des premiers jets ? Jamais Parfois Toujours

Si oui, avant ou après le lavage des trayons ? AVANT / APRÈS

<i>Élimination des bouses pendant la traite ?</i>	Jamais	Parfois	Toujours
<i>Griffe sale nettoyée avant la pose ?</i>	Jamais	Parfois	Toujours

Après la traite

Réalisez-vous un post-trempage ? OUI / NON

Si oui, vous utilisez un produit :

Désinfectant : OUI / NON

Odorant : OUI / NON

Non filmogène (pas de résidu à la traite) : OUI / NON

Notes :

- *type produit :* _____
- *nom du produit :* _____
- *Composition :* _____

Désinfection des griffes entre les vaches à cellules ? (ex : peroxyde)

Si oui, avec quel produit ? _____

Après la traite, quelle est l'activité des vaches laitières ? Manger / Se coucher / Libre

PARTIE 5 : BÂTIMENT

Année de construction du bâtiment : _____

Selon vous, votre bâtiment est-il :

- 1 : vétuste, perméable aux intempéries et qui se dégrade
- 2 : correct, perméable aux intempéries et qui se dégrade
- 3 : correct, perméable aux intempéries, stable
- 4 : correct, imperméable aux intempéries, stable
- 5 : neuf, imperméable et stable

Commentaires : _____

D'après vous, comment est la ventilation du bâtiment : BONNE CORRECTE INSUFFISANTE

Comment est gérée la ventilation de votre bâtiment ? _____

Vide sanitaire : OUI / NON

Période : _____

Durée : _____

Motif : Alpage, traite mobile, autre : _____

Désinfection du bâtiment : OUI NON

Nettoyage / blanchiment bâtiments

Fréquence : _____

Période : _____

Produit : _____

Y-a-t-il d'autres animaux (chèvres, poules, brebis, ânes...) que les bovins dans la stabulation ?

Préciser (en contact avec les VL ?) _____

Présence d'oiseaux dans le bâtiment ?

OUI

NON

PARTIE 6 : ALIMENTATION

Rations

Quand est-ce que l'alimentation est distribuée ? (*plus de flores lactiques si distribution foin avant traite)

Avant la traite

Pendant la traite

Après la traite

Nombre de places au cornadis : _____

Comment distribuez-vous la ration ? (à la main, mélangeuse...) : _____

Est-ce qu'il y a un DAC dans le bâtiment ? OUI / NON

Est-ce que les vaches mangent du concentré à la traite ou durant la journée ? _____

Si oui, quantité de concentré VL/j : _____ (cf tableau)

Autonomie fourragère : OUI / NON

Mode de récolte des fourrages :

- | | | | | |
|---|-----------------|-----|---|-----|
| - | Séché au sol : | OUI | / | NON |
| - | Séché en grange | OUI | / | NON |
| - | Ensilage | OUI | / | NON |
| - | Enrubannage | OUI | / | NON |

Produisez-vous vos céréales ? OUI / NON

Si oui, % : _____

Présence de rats taupiers dans les champs ? OUI / NON

Présence de terre dans les fourrages récoltés ? OUI / NON

Quelle est votre ration hivernale ?

	%	Kg/VL/j	Commentaires
Concentrés (du commerce)	/		
Aliment produit à la ferme (si il y a)			
Foin			
Regain			
Luzerne Préciser : foin de luzerne, luzerne déshydratée ...			
Enrubannage			
Ensilage plante entière			
Ensilage herbe			
Ensilage épi			
Céréales			
Autres			

Micro-organismes (Levures vivantes, bactéries, etc)

Faites-vous ajouter des levures dans les aliments complémentaires achetés ou aliments minéraux :

OUI / NON

Utilisez-vous des micro-organismes dans l'alimentation des vaches ? OUI / NON

Lesquels (nom du produit, marque) : _____

Pour quelles raisons utilisez-vous des probiotiques ?

Pratiques d'utilisations :

- A quelle fréquence l'utilisez-vous ? _____
- Quelle quantité utilisez-vous ? _____
- Sous quelle forme sont-ils utilisés : SOLIDE / LIQUIDE
- A quel moment ? _____

EAU

Etat des abreuvoirs : NEUF CORRECT ABÎMÉ (rongé/fuite)

Quelle est l'origine de l'eau (source, réseau) ? : _____

Traitement de l'eau : OUI / NON

si oui, quel type de traitement ? _____

PARTIE 7 : SANITAIRE

Quel souci avez-vous eu sur le troupeau dernièrement ? (cellules, fièvre Q, boiteries...)

Comment identifiez-vous, à la traite, les vaches ayant un problème : Bracelet / Peinture / Autre

Quelles sont vos principales causes de réforme ? _____

Nombre de cas de mammites par an ? _____

Plutôt l'hiver ou l'été ? _____

En cas de mammite, faites vous des analyses de lait pour identifier les germes ? OUI / NON

Si oui quels sont les germes en cause ? _____

Y a-t-il un historique sanitaire (Listeria, salmonelle, STEC) ? _____

Est-ce que l'origine du problème a été identifiée ? _____

Fiche des notations et d'observations

- Observations et notation à faire une seule fois)

Id : E.....

Tapis

Epaisseur tapis-matelas (cm) :

Surface logette : x

Logettes

Nb logettes total :

Nb de logette avec particularités (poussière importante, non accessible aux vaches :

Calcul : Nb de logettes éligibles aux prélèvements =

Nb de logettes qui serontensemencée =

Eau :

Propreté des abreuvoirs : propre sale

Ambiance du bâtiment

Atmosphère et ouverture du bâtiment :

Notation de l'atmosphère ambiante selon l'échelle suivante :

- 1: bâtiment fermé et hermétique
- 2 : bâtiment peu ouvert et sans courant d'air
- 3 : bâtiment peu ouvert et léger courant d'air
- 4 : bâtiment très ouvert et léger courant d'air
- 5 : bâtiment très ouvert et courant d'air

Luminosité : Suffisante Insuffisante

Propreté générale du bâtiment : Propre Correct Sale

Ventilation du bâtiment : Bonne Correcte Insuffisante

Ouverture du bâtiment :

- très ouvert (beaucoup d'ouvertures et continuellement ouvert)
- peu ouvert (occasionnellement ouverte)
- fermé (pas d'ouverture)

Forte odeur **d'ammoniac** dans le bâtiment ? OUI / NON

Propreté globale (au delà des logettes, et des couloirs), en regardant les murs :
Propre Correct Sale

Autres commentaires : _____

- Observation et notation à faire à chaque suivi

Id. : E...

Suivi : 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Hygrométrie et température :

		Emplacement 1	Emplacement 2	Emplacement 3
Jour 1	Hygrométrie			
	T°			
Commentaire : <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lieu mesure :</i> • <i>Heure :</i> • <i>Météo :</i> • <i>Cdt° particulière :</i> 				
Jour 2	Hygrométrie			
	T°			
Commentaire : <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lieu mesure :</i> • <i>Heure :</i> • <i>Météo :</i> • <i>Cdt° particulière :</i> 				
Jour 3	Hygrométrie			
	T°			
Commentaire : <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lieu mesure :</i> • <i>Heure :</i> • <i>Météo :</i> • <i>Cdt° particulière :</i> 				

Id. : E...

Suivi : 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Mesure pH

Faire les mesures de pH dans 3 logettes différentes. Dans chaque logette, prendre le pH à 3 endroits différents mais uniquement le tiers arrière de la logette et faire la moyenne. Relever également la température indiquée par le pH mètre au moment de la mesure.

	Logette 1		Logette 2		Logette 3	
	pH ₁	T° au sol ₁	pH ₂	T° au sol ₂	pH ₃	T° au sol ₃
Jour 1						
Jour 2						
Jour 3						

Précisions

- sur l'état du tapis :

J1

J2

J3

- particularité :

J1

J2

J3

Id. : E...

Suivi : 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Evaluation propreté de la litière – Logette tapis

Noter l'état des logettes d'après l'échelle suivante :

- 1 : très humide et très sale
- 2 : humide et sale
- 3 : humide et propre
- 4 : peu humide et propre
- 5 : sec et propre

		État propreté – Logette tapis					Dernier raclage et Remarques
		1	2	3	4	5	
Jour 1	Logette 1						
	Logette 2						
	Logette 3						
Jour 2	Logette 1						
	Logette 2						
	Logette 3						
Jour 3	Logette 1						
	Logette 2						
	Logette 3						

Nb de logette avec la note 1 et 2 : = %
Nb de logette total dans la ferme :

Id. : E...

Suivi : 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Evaluation propreté des vaches

Selon Canadian Bovine Mastitis Research Network. Cette grille de référence se trouve en annexe du mémoire de fin d'études

JOUR 1	Pis				Pattes arrière				Flancs et cuisses			
Score	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Vache 1												
Vache 2												
Vache 3												
Vache 4												
Vache 5												
Vache 6												
Vache 7												
Vache 8												
Vache 9												
Vache 10												

Nb de vache total dans la stabulation :

Nb de vache avec la note Pis 3 et 4 : = % (norme : <10%)

Nb de vache avec la note Patte arrière 3 et 4 : = % (norme : <50%)

Nb de vache avec la note Flancs/Cuisse 3 et 4 : = % (norme : <10%)

Id. : E...

Suivi : 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Lait

Lait prélevé le : MATIN / SOIR

Heure de prélèvement

- jour 1 :
- jour 2 :
- jour 3 :

Partie 2 : Résultats

1. Contextualisation des données

Les deux groupes : Témoin et Ensemencement, sont comparés, selon plusieurs variables, afin de vérifier qu'il n'y ait pas de différence significative entre eux.

Critères généraux

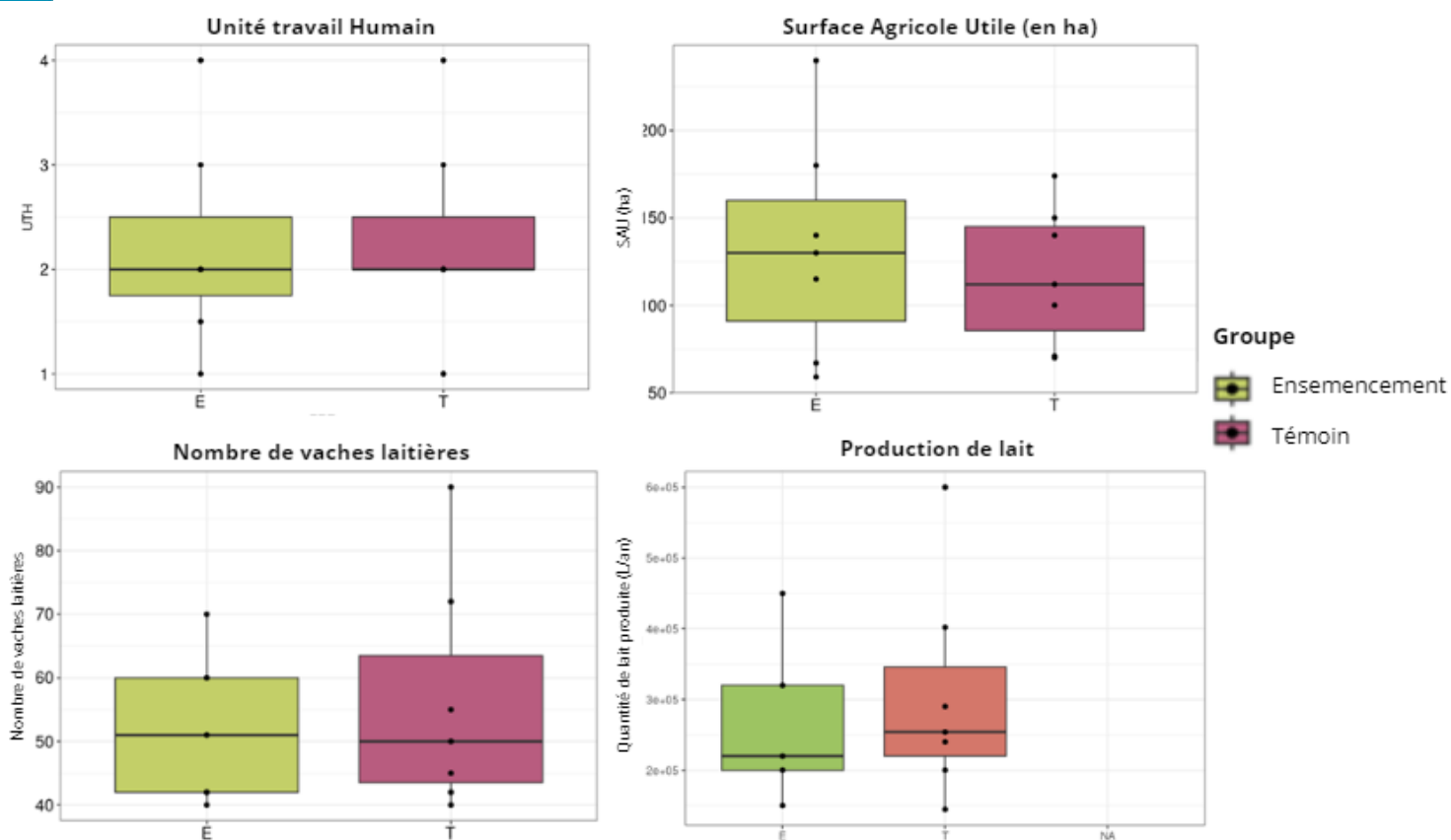


Figure 19: Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon des variables classiques pour décrire une ferme (UTH, SAU, effectif du troupeau, production annuelle)

L'encadré ci-dessous présente les valeurs décrivant notre échantillon d'exploitations selon les groupes Ensemencement et Témoin

- UTH

E: min= 1, moyenne=2.21, médiane=2, max=4, écart-type=sd=0.99

T: min= 1, moyenne = 2.28, médiane=2, max=4, sd=0.95

- SAU

E: min 59, moyenne=133, médiane=130, max=240, sd=63.07

T: min= 70, moyenne = 116, médiane= 112, max=174, sd= 39.8

- Nombre de vaches laitières

E:min = 40, moyenne= 52.14, médiane= 51, max= 70, sd=11.52

T : min = 40, moyenne= 56.28, médiane=50, max=90, sd=18.35

- Production de lait annuelle (en litres)

E= min : 150 000, moyenne = 268 000, médiane= 220 000, max= 450 000, sd= 119

037

T: min= 144 497, moyenne= 304 356, médiane= 254 000, max= 600 000, sd= 152 898

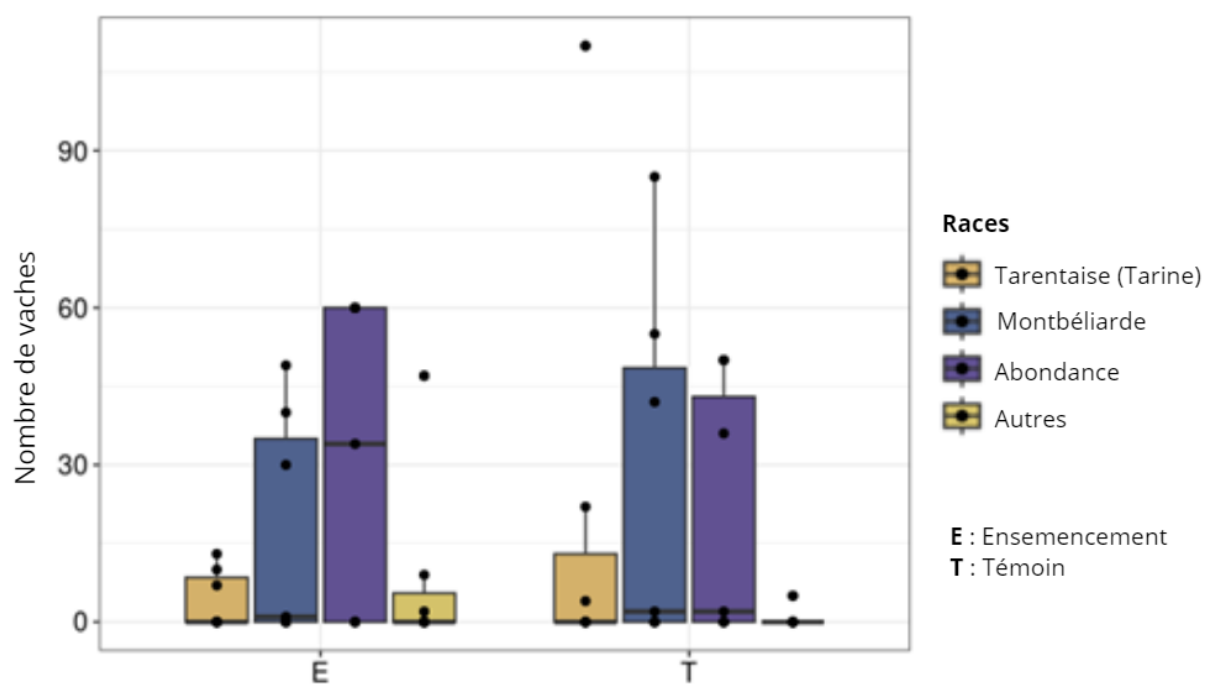


Figure 20: Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon la race des vaches laitières

Le nombre de vache de la catégorie de race « Autres » est supérieure dans le groupe Ensemencement par rapport au groupe Témoin avec une p-value de 0,0233.

Il y a également plus de vaches de race Montbéliarde que d'Abondance dans le groupe Témoin, ce qui n'est pas le cas du groupe ensencé. Il y a donc une différence entre ces deux groupes, et la p-value est de 0.0451

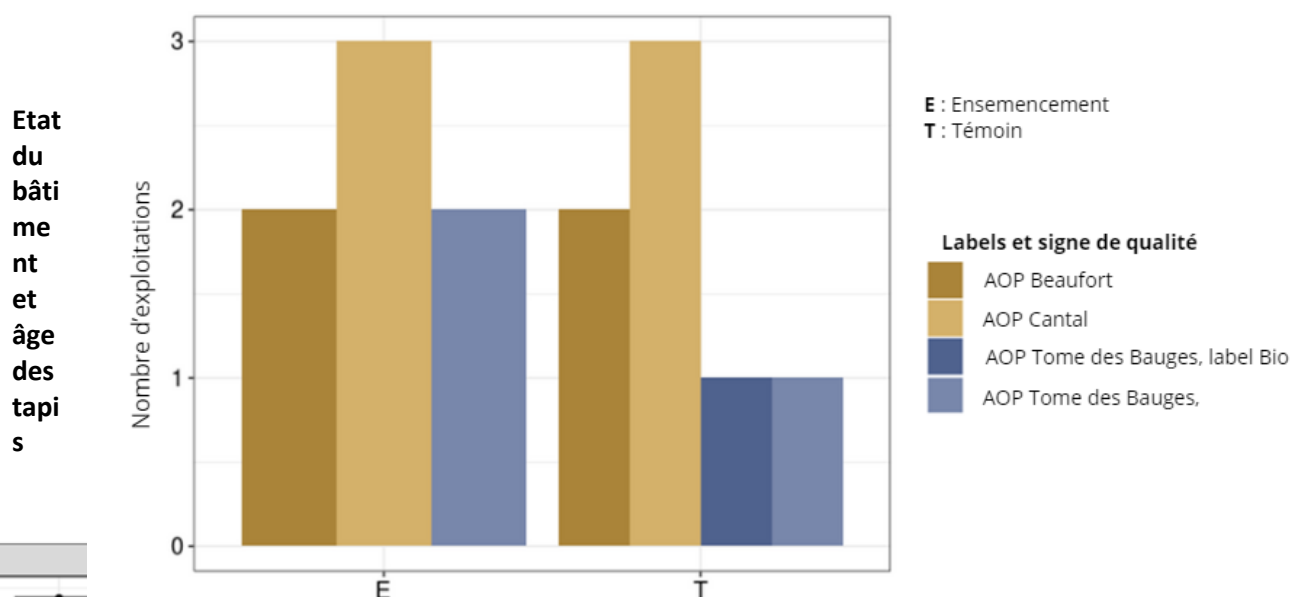
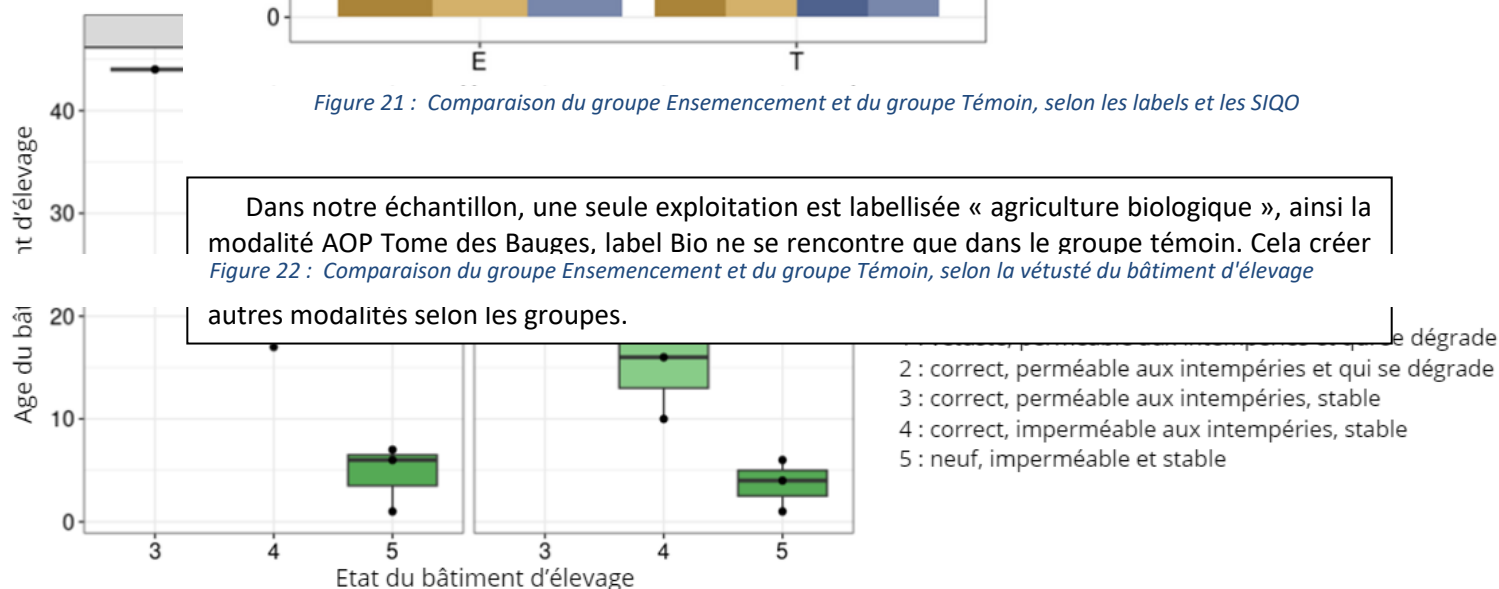


Figure 21 : Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon les labels et les SIQO

Dans notre échantillon, une seule exploitation est labellisée « agriculture biologique », ainsi la modalité AOP Tome des Bauges, label Bio ne se rencontre que dans le groupe témoin. Cela crée

Figure 22 : Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon la vétusté du bâtiment d'élevage

autres modalités selon les groupes.



Il existe une corrélation négative entre l'âge et l'état du bâtiment d'élevage. Plus le bâtiment est âgé, plus son état est dégradé.

Cette corrélation n'est pas différente par groupe. Toutefois, le groupe ensencé est le seul qui montre la note 3.

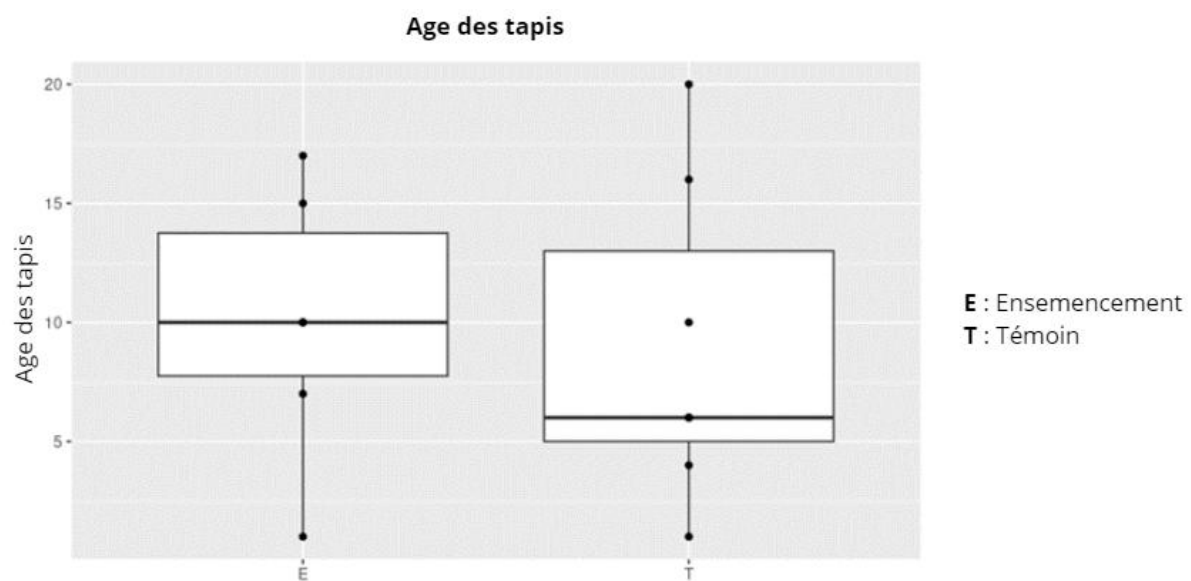


Figure 23 : Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon l'âge des tapis

Pratique de raclage

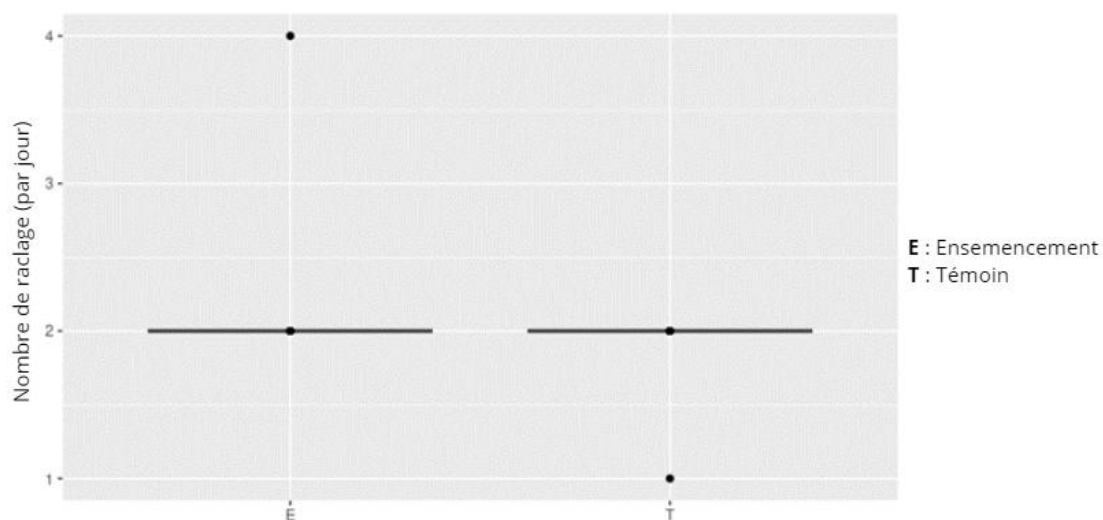


Figure 24 : Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon la fréquence de raclage

Sanitaire

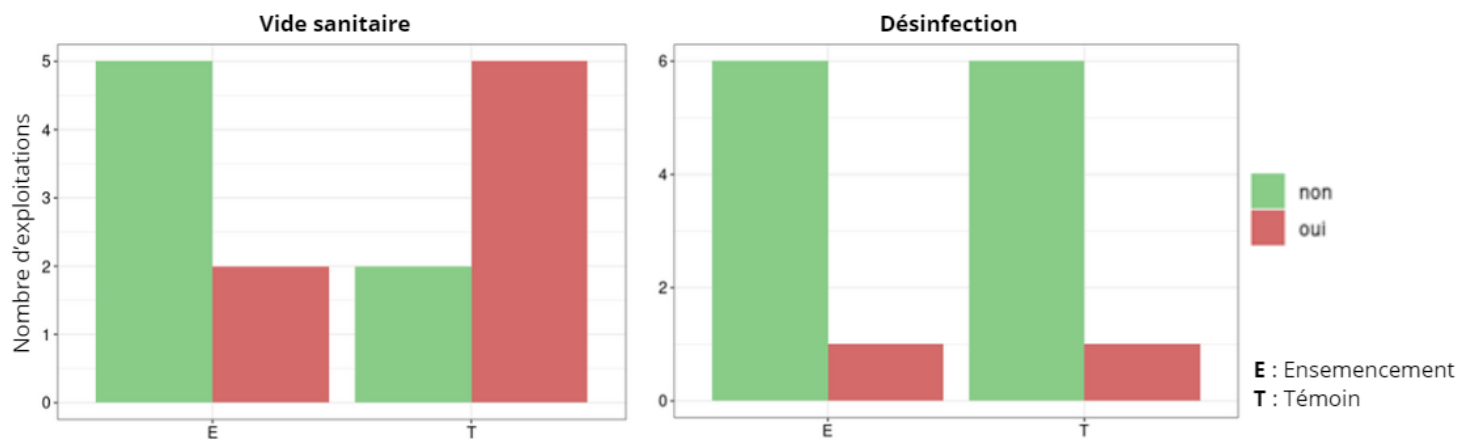


Figure 25 : Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon les pratiques sanitaires

Alimentation et eau

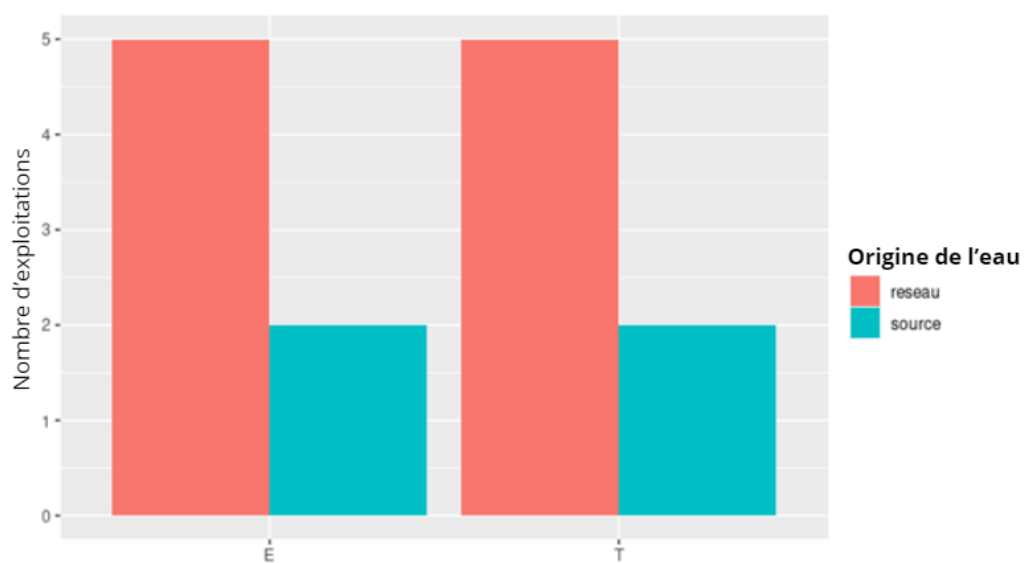


Figure 26 : Comparaison du groupe Ensemencement et du groupe Témoin, selon l'origine de l'eau des abreuvoirs

2. Effet du produit d'ensemencement sur d'autres paramètres : pH de la zone de couchage et propreté des vaches

pH à la surface des tapis

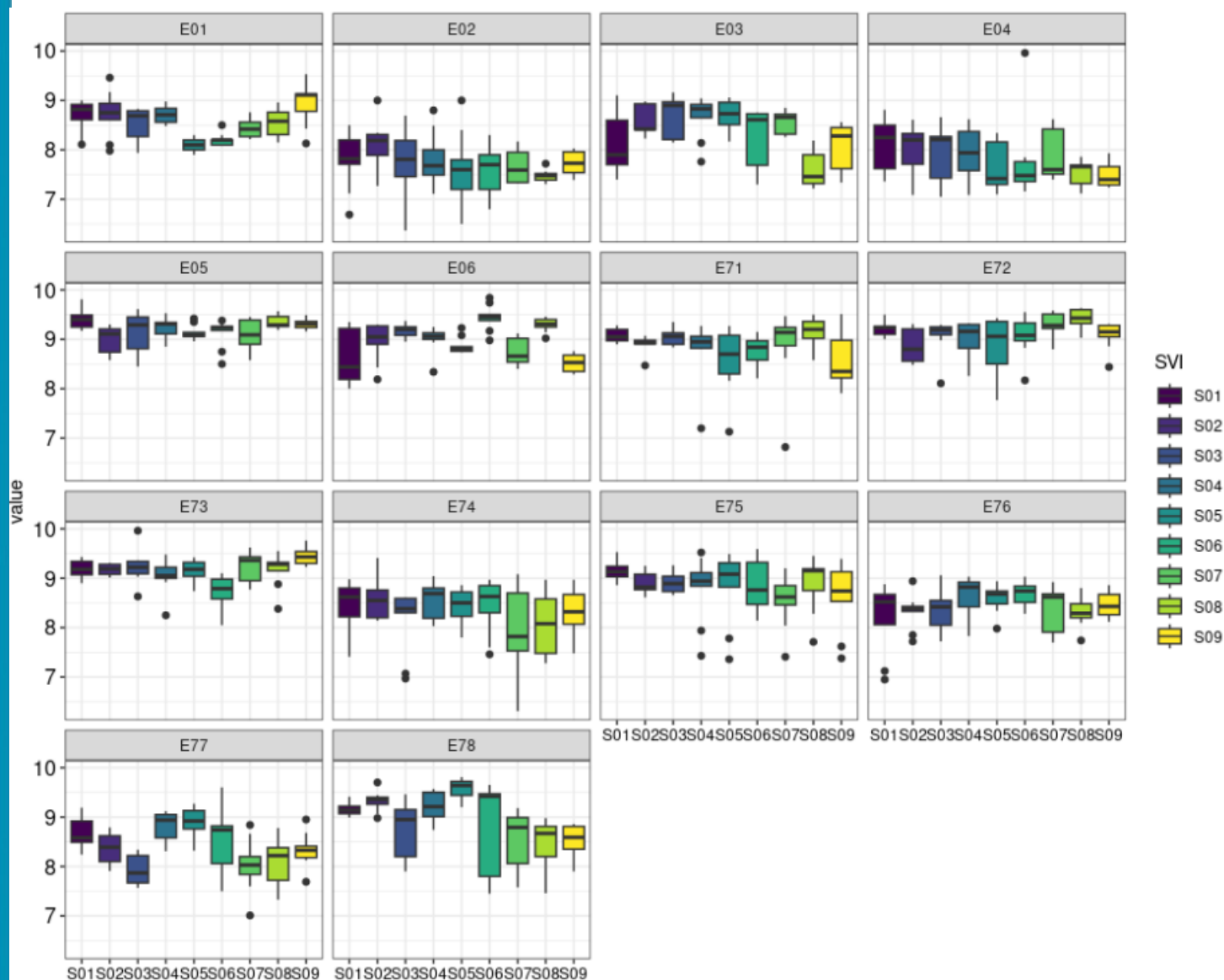


Figure 27 : Evolution du pH au cours des suivis, ferme par ferme

Témoïn	Ensemencement
E01 S05 < S01 (0.0027), S05<S02 (0.0025), S05< S03 (0.0260), S05<S04 (0.0023) S06<S01 (0.0085), S06<S02 (0.0083), S06<S03 (0.0651), S06<S04 (0.0067) S07>S05 (0.0465), S08>S05 (0.0147), S08>S06 (0.0427), S09>S05 (0.0002), S09>S06 (0.0010), S09> S07 (0.0426)	E02 pas de différence significative (0.2)
E03 S03>S01(0.0435), S04>S01(0.0585), S05>S01(0.0450), S08<S02(0.0043), S08<S03(0.0010), S08<S04(0.0007), S08<S05(0.0006), S08<S06(0.0342), S08<S07(0.0073) S09<S03(0.0238), S09<S04(0.0308), S09<S05(0.0236)	E04 pas de différence significative (0.08)
E05 S05<S01 (0.0583), S08 >S02 (0.0304), S09>S02 (0.0450)	E06 S03>S01(0.0248), S05<S03 (0.0435), S06>S01 (0.0008), S06>S02 (0.0150), S06>S04 (0.0158), S06>S05 (0.0014), S07<S03 (0.0171), S07<S06 (0.0004), S08>S01(0.0024), S08>S02 (0.0370), S08>S04 (0.0378), S08>S05 (0.0059), S08>S07 (0.0015), S09<S02 (0.0274), S09<S03 (0.0018), S09<S04 (0.0265), S09<S06 (0.0000), S09<S08 (0.0001)
E72 S08>S02 (0.0123), S08>S03 (0.0491), S08>S05 (0.0431)	E71 pas de différence significative
E74 pas de différence significative (0.65)	E73 S06<S01 (0.0201), S06<S02 (0.0488), S06<S03 (0.0227), S06<S05 (0.0429), S07>S06 (0.0119), S08>S06 (0.0301), S09>S02 (0.0367), S09>S04 (0.0276), S09>S05 (0.0411), S09>S06 (0.0001)
E75 pas de différence significative (0.32)	E76 pas de différence significative (0.14)
E77 S03<S01 (0.0058), S04>S02 (0.0424), S04>S03 (0.0013), S05>S02 (0.0254), S05>S03 (0.0007), S06>S03 (0.0138), S07<S01 (0.0259), S07<S04 (0.0051), S07<S05 (0.0027), S07<S06 (0.0433), S08<S01 (0.0263), S08<S04 (0.0053), S08<S05 (0.0031), S08<S06 (0.0495), S09<S04 (0.0449), S09<S05 (0.0254)	E78 S03<S02 (0.0310), S05>S01 (0.0467), S05>S03 (0.0021), S06<S05 (0.0369), S07<S01 (0.0361), S07<S02 (0.0071), S07<S04 (0.0189), S07<S05 (0.0002), S07<S06 (0.0459), S08<S01 (0.0149), S08<S02 (0.0023), S08<S04 (0.0079), S08<S05 (0.0001), S08<S6 (0.0189), S09<S01 (0.0148), S09<S02 (0.0021), S09<S04 (0.0068), S09<S05 (0.0000), S09<S06 (0.0190)

*Tous les chiffres entre parenthèse sont des p-value

Tableau 5 : Comparaison des pH au cours des suivis, pour chaque ferme

>> Dans combien de fermes du groupe Ensemencement, le pH à court terme diminue-t-il par rapport à l'état initial ?

2 fermes (E06, E73) parmi les 7 fermesensemencées présente des pH plus faibles à court terme qu'à l'état initial. Au total 6 suivis de la période court terme ont des pH inférieurs à ceux de la période avant ensemencement.

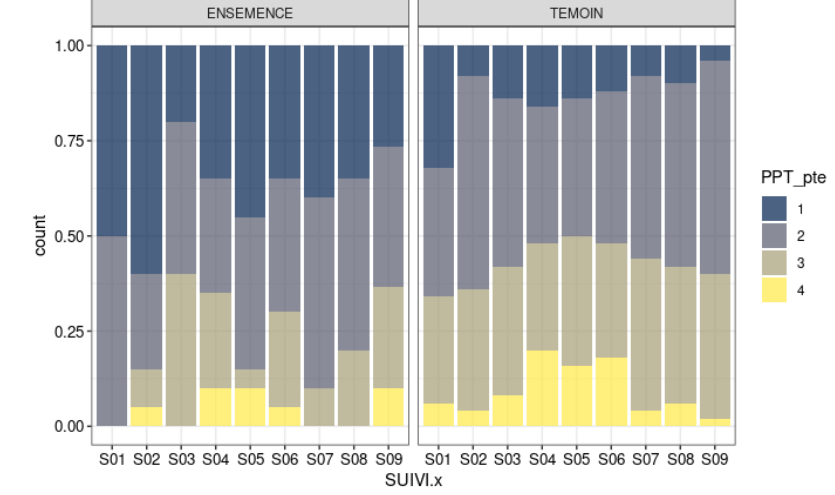
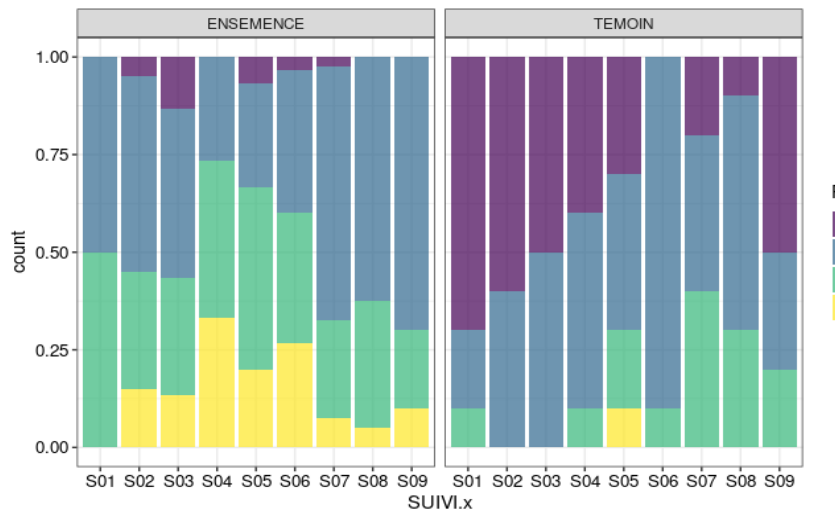
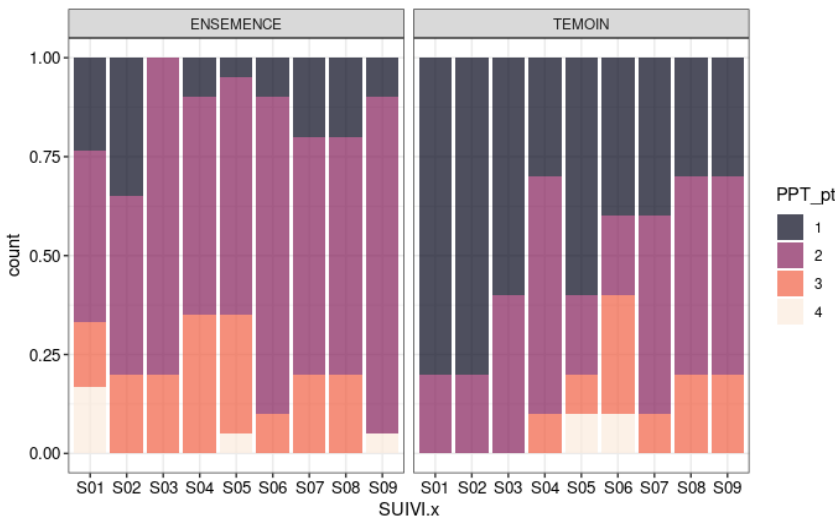
>> Dans combien de fermes de groupe Témoin, le pH à court terme diminue-t-il par rapport à l'état initial ?

2 fermes (E01, E05) parmi les 7 fermes témoins présente des pH plus faibles à court terme qu'à l'état initial. Au total 7 suivis de la période court terme ont des pH inférieurs à ceux de la période état initial

Pour conclure, chaque groupe présente un ratio de 2 fermes sur 7 pour lesquelles le pH diminue à court terme par rapport à l'état initial. Ainsi, nous ne pouvons pas dire que le produit d'ensemencement à un effet sur le pH à court terme, et encore moins à long terme.

Propreté des vaches selon le moment de notation

- Propreté des pattes arrière

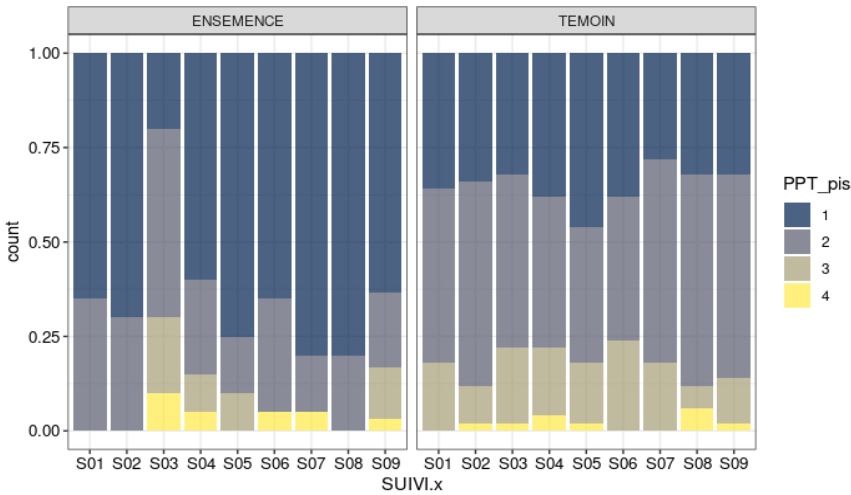
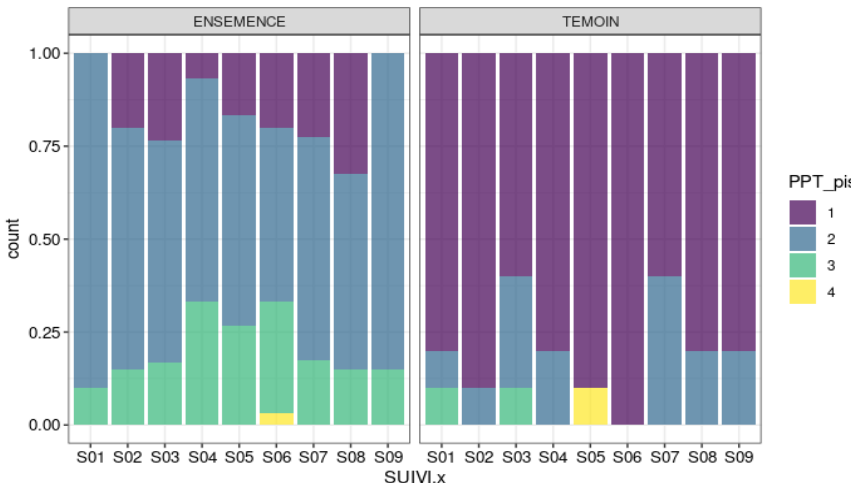
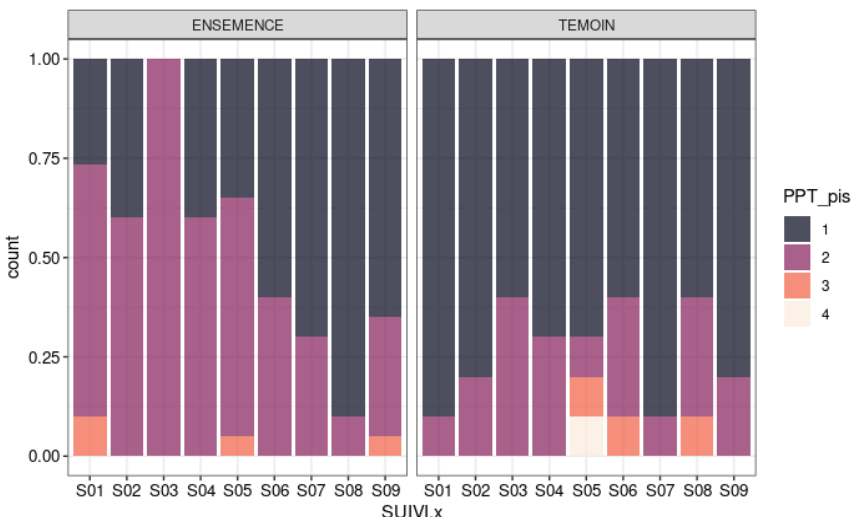
Moment de l'observation	Résultats de la propreté des pattes arrière des vaches laitières	Commentaires
Matin		<p>Dès l'état initial, nous pouvons observer une différence entre les deux groupes, ainsi nous ne pouvons pas conclure sur l'effet du produit</p>
Après midi		<p>Il y a plus de note 4 à court terme dans le groupe Ensemencement. Mais il y a de toutes façons moins de 4 dans le groupe Témoin dès l'état initial. De ce fait nous ne pouvons pas conclure sur un effet du produit.</p>
Soir		<p>Dès l'état initial, nous pouvons observer une différence entre les deux groupes, ainsi nous ne pouvons pas conclure sur l'effet du produit</p>

- Propreté des flancs et des cuisses

Moment de l'observation	Résultats de la propreté des flancs et des cuisses des vaches laitières	Commentaires
Matin		Nous observons une différence entre les deux groupes dès le début des suivis (état initial), donc ce n'est pas le produit d'ensemencement qui est responsable du meilleur état de propreté des flancs et des cuisses des vaches du groupe Ensemencement
Après midi		Dans les deux cas (après midi et soir), nous observons un effet groupe (c'est-à-dire une différence entre le groupe Témoin et Ensemencement dès l'état initial). Ce n'est donc pas un effet lié au produit d'ensemencement
Soir		

- Propreté des mamelles

Moment	Résultats de la propreté des mamelles des vaches laitières	Commentaires
--------	--	--------------

de l'observation		
Matin		
Après midi		<p>A chaque fois, nous observons un effet groupe et non pas un effet lié au produit d'ensemencement. En effet, il y a une différence entre le groupe Témoin et Ensemencement dès l'état initial).</p>
Soir		

Auteur :
BONDAT Julia

Thème : RECHERCHE - DEVELOPPEMENT
Confidentiel : Non

Etude de l'impact d'un produit d'ensemencement des litières sur les écosystèmes

microbiens

Cas des systèmes bovins laitiers

Study of the impact of a litter seeding product on microbial ecosystems Case of dairy cattle systems

Mots-clés : produit d'ensemencement, lait cru, bactéries, zone de couchage, trayons, vaches laitières

Key-words : seeding product, raw milk, bacteria, lying area, teats, dairy cows

Résumé :

Utilisé pour la fabrication de nombreux fromages sous AOP ou IGP, le lait cru est naturellement riche en microorganismes. Ces derniers contribuent à la diversité et à la richesse sensorielle des fromages. Toutefois, le lait cru est à l'origine de plusieurs crises sanitaires récentes en raison de la présence possible de microorganismes pathogènes. Les pratiques de gestion des litières des éleveurs peuvent modifier l'abondance et la diversité des microorganismes de l'environnement, influençant ainsi la microflore du lait. Parmi ces pratiques, l'ajout d'additifs est couramment utilisé dans la région Auvergne-Rhône-Alpes, et certains de ces additifs contiennent des complexes microbiens. Cette étude, menée en Savoie et dans le Massif Central, vise à comprendre les effets d'un produit d'ensemencement sur les écosystèmes microbiens des zones de couchage, des trayons et du lait cru dans les élevages bovins laitiers. Deux approches analytiques ont été mobilisées : des analyses pasteuriennes ciblées couplées à une méthode omique (métabarcoding ADN16S). Ce mémoire présente uniquement les résultats des analyses pasteuriennes, montrant ainsi l'influence du produit d'ensemencement sur certains microorganismes sur les zones de couchage (bactéries lactiques mésophiles et spores de *Bacillus*) mais cette influence semble limitée à ce compartiment. Les résultats des analyses métabarcoding ADN 16S permettront d'approfondir l'effet éventuel du produit sur les communautés bactériennes.

Abstract :

Used to make many cheeses under PDO or PGI, raw milk is naturally rich in microorganisms. These contribute to the diversity and sensory richness of cheeses. However, raw milk is at the origin of several recent health crises due to the possible presence of pathogenic microorganisms. Farmers' litter management practices can modify the abundance and diversity of environmental microorganisms, thus influencing the milk microflora. Among these practices, the addition of additives is commonly used in the Auvergne-Rhône-Alpes region, and some of these additives contain microbial complexes. This study, carried out in Savoie and the Massif Central, aims to understand the effects of a seeding product on the microbial ecosystems of lying areas, teats and raw milk in dairy cattle farms. Two analytical approaches were used: targeted Pasteurian analyzes coupled with an omics method (DNA metabarcoding). This report only presents the results of Pasteurian analyses, thus showing the influence of the seeding product on certain microorganisms on the bedding areas (mesophilic lactic acid bacteria and *Bacillus* spores) but this influence seems limited to this compartment. The results of the 16S DNA metabarcoding analyzes will make it possible to further explore the possible effect of the product on bacterial communities.

Nombre de pages du document final : 96

Demandeur (entreprise, organisme...) :

CENTRE DE RESSOURCES POUR AGRICULTURE DE QUALITE ET DE MONTAGNE