



# **Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques du lait en fonction des pratiques de gestion à la ferme**

**Thèse**

**Mérilie Gagnon**

**Doctorat en microbiologie agroalimentaire  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)**

Québec, Canada

# **Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques du lait en fonction des pratiques de gestion à la ferme**

**Thèse**

**Mérilie Gagnon**

Sous la direction de :

Denis Roy

Yvan Chouinard, codirecteur de recherche

# Résumé

La qualité microbiologique des produits alimentaires est primordiale, que ce soit pour la salubrité ou l'innocuité alimentaire ou la consistance de ceux-ci. Dans le cas des produits laitiers comme le fromage cheddar, il est important de s'intéresser au microbiote du lait cru et principalement aux bactéries lactiques (LAB) résistantes au traitement thermique appliqué au lait. Ces LAB font partie de la flore secondaire du fromage et sont parfois responsables de défauts organoleptiques. Comme le microbiote du lait cru est modulé par l'environnement de la ferme, il est tout indiqué d'évaluer l'impact de différentes pratiques de gestion à la ferme susceptibles d'influencer le niveau de LAB dans le lait. Cette thèse s'est intéressée premièrement à l'ensilage, des plantes fourragères fermentées en anaérobiose par des LAB et l'impact de son inoculation avec *Lactobacillus buchneri*. Un total de 24 fermes utilisant différents fourrages (foin, ensilages inoculés ou non de graminées, de légumineuse ou de maïs) a été échantillonné à deux reprises (automne 2015 et printemps 2016). Nos résultats indiquent que l'ensilage constitue pour le lait cru une source mineure de contamination en LAB, car le typage des isolats a montré un taux de transfert des souches de 6%. De plus, *Lactobacillus buchneri*, très présent dans tout type d'ensilages (42%) et utilisé comme inoculant, a été rarement isolé dans les laits. Par ailleurs, une souche de *Lactobacillus plantarum* RKG 2-212 collectée dans le lait et qui provenait de l'ensilage de maïs a démontré une résistance à la chaleur significativement supérieure à la souche de référence *L. plantarum* ATCC 14917 ( $P < 0.0001$ ). Son impact lors de la fabrication et l'affinage du cheddar a été évalué et comparé à une autre souche thermorésistante, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10. Bien que n'influençant pas l'acidification du lait lors de la production modèle d'un cheddar, *L. plantarum* RKG 2-212 a eu un effet sur l'affinage. Après 12 jours à 30 °C, l'augmentation de sa population a diminué significativement le pH de la pâte. De plus, des changements dans les composés volatils ont été observés dont certains correspondent à des saveurs imprévisibles au cheddar. La deuxième pratique à la ferme qui a été évaluée est l'utilisation de la litière de fumier recyclé (LFR) qui gagne en popularité. En raison de la charge bactérienne élevée du fumier et du procédé de fabrication de cette litière, il semble probable qu'elle soit une source de contamination en LAB thermorésistantes pour le lait. Des laits provenant de 84 fermes utilisant la LFR ou la paille ont été analysés au printemps 2018. Cette étude a démontré que l'abondance des spores de bactéries d'altération n'était pas supérieure dans les laits associés à la LFR. Cependant, les *Streptococcus* sp. et les *Enterococcus faecalis* thermorésistants étaient plus prévalents dans les échantillons de lait associés à la LFR. Parmi ceux-ci, trois *E. faecalis* et un *Streptococcus thermophilus* ont démontré une excellente survie durant la production expérimentale de cheddar (test de Pearce). Ces derniers pourraient avoir des effets néfastes lors de l'affinage. En conclusion, des pratiques de gestion à la ferme comme l'utilisation de l'ensilage et la LFR peuvent moduler les LAB du lait et il est possible que les bactéries thermorésistantes influencent négativement la production fromagère. Les producteurs et

transformateurs laitiers devraient considérer l'impact de l'utilisation de la LFR et de l'ensilage sur les bactéries thermorésistantes du lait afin de développer des stratégies pour les minimiser.

# Abstract

The microbiological quality of food is essential, whether for food safety or for the product consistency. For dairy products, including cheddar cheese, the focus should be on milk microbiota and mainly on lactic acid bacteria (LAB) resistant to the heat treatment applied to milk. These LAB in cheese are called non-starter lactic acid bacteria and they are sometimes responsible for organoleptic defects. As the raw milk microbiota is modulated by the farm environment, the impact of different farm management practices that may influence the presence of LAB in milk should be assessed. This thesis firstly focused on silage, forage plant anaerobically fermented with LAB and the impact of its inoculation with *Lactobacillus buchneri*. A total of 24 farms using different forages (hay, grasses, legumes or corn silage inoculated or not) were sampled twice (fall 2015 and spring 2016). Silage has been shown to be a minor source of LAB contamination for milk. The typing of isolates indicated a 6% transfer rate of the strains. Also, *Lactobacillus buchneri*, which is often present in all types of silage (42%) and used as an inoculant, has been rarely isolated from milk. A strain of *Lactobacillus plantarum* RKG 2-212 collected in milk and which came from corn silage demonstrated a thermostability significantly higher than the reference strain *L. plantarum* ATCC 14917 ( $P < 0.0001$ ). Its impact during the production and ripening of cheddar was evaluated and compared with another thermostable strain, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10. Although it did not influence the acidification of milk in the model production of a cheddar, *L. plantarum* RKG 2-212 impacted ripening. After 12 days at 30°C, the increase in its population significantly decreased the pH of the curd. Moreover, changes in volatile compounds have been observed, some of which correspond to unsuitable flavor. The second farm management practice that has been evaluated is the recycled manure solids bedding (RMS) which is gaining popularity. Due to the high bacterial load of the manure and the manufacturing process of this litter, it seems likely that it is a source of thermostable LAB for milk. Milk samples from 84 farms using RMS or straw bedding were analyzed in spring 2018. This study demonstrated that the spores of spoilage bacteria were not higher in RMS-milk samples. However, *Streptococcus* sp. and *Enterococcus faecalis* were more prevalent in RMS-milk samples. Of these, three *E. faecalis* and one *Streptococcus thermophilus* demonstrated excellent survival during experimental cheddar production (Pearce activity test). These could cause defects during cheese ripening. In conclusion, farm management practices such as the use of silage and RMS can modulate LAB in milk and may have a negative impact on cheese production. Dairy farmers and processors should consider the impact of RMS and silage on thermostable bacteria in milk in order to develop strategies to minimize them.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations, sigles, acronymes .....	xvii
Remerciements.....	xxi
Avant-propos .....	xxii
Introduction .....	1
Chapitre 1 – Revue de littérature .....	3
1.1     La production laitière .....	3
1.1.1     Pratiques de gestion à la ferme .....	3
1.1.1.1     L'ensilage .....	3
1.1.1.1.1     Les inoculants .....	5
1.1.1.2     Litière.....	6
1.1.1.2.1     Litière à base de fumier recyclé .....	6
1.2     La fabrication fromagère .....	7
1.2.1     Le cheddar .....	8
1.2.2     Microbiote du fromage .....	8
1.2.2.1     Bactéries lactiques.....	9
1.2.2.1.1     Bactéries lactiques utilisées comme ferment.....	12
1.2.2.2     Microbiote, affinage et flaveurs .....	12
1.2.2.2.1     Bactéries lactiques de la flore secondaire .....	14
1.2.2.2.2     Métabolisme du lactose résiduel, de l'acide lactique et du citrate .....	15
1.2.2.2.3     Lipolyse et métabolisme des acides gras.....	15
1.2.2.2.4     Protéolyse et catabolisme des acides aminés.....	16
1.2.2.2.5     Flaveur du cheddar .....	19
1.3     Hypothèse et objectifs .....	22
1.3.1     Hypothèse générale .....	22
1.3.2     Hypothèses spécifiques .....	22

1.3.3	Objectif général .....	22
1.3.4	Objectifs spécifiques .....	22
	Chapitre 2 – Prévalence et abondance des bactéries lactiques dans le lait cru associées aux types de fourrage utilisés dans l'alimentation de la vache laitière .....	23
2.1	Résumé .....	23
2.2	Abstract .....	24
2.3	Introduction .....	24
2.4	Materials and Methods .....	25
2.4.1	Farm Sampling .....	25
2.4.1.1	Herd Selection .....	25
2.4.1.2	Sampling, isolation, and quantification of lactic acid bacteria .....	26
2.4.2	Bacterial identification and typing .....	28
2.4.3	Antibacterial agar diffusion assay .....	29
2.4.4	Statistical analysis .....	29
2.5	Results .....	30
2.5.1	Lactic acid bacteria prevalence and abundance in forages .....	30
2.5.2	Lactic acid bacteria prevalence and abundance in bulk tank raw milk .....	34
2.5.3	Screening for bacteriocin activity .....	35
2.5.4	Typing of bacteria potentially transferred from forage to milk .....	38
2.6	Discussion .....	42
2.7	Conclusions .....	44
2.8	Acknowledgments .....	45
	Chapitre 3 – Impact de deux bactéries lactiques thermorésistantes de la flore secondaire sur la fabrication modèle de cheddar .....	46
3.1	Résumé .....	46
3.2	Abstract .....	47
3.3	Introduction .....	48
3.4	Material and methods .....	49
3.4.1	Strains, culture conditions and viable counts .....	49
3.4.2	Genome sequencing .....	50
3.4.3	Thermoresistance assay .....	50
3.4.4	Model Cheddar production .....	50
3.4.4.1	Pearce activity test .....	50
3.4.4.2	Cheese slurry .....	51

3.4.4.3	DNA extraction and PMA-qPCR .....	51
3.4.4.4	Volatile compound analysis .....	52
3.4.5	Statistical analysis.....	52
3.5	Results .....	53
3.5.1	Comprehensive genome analysis .....	53
3.5.2	Thermoresistance .....	57
3.5.3	Bacterial activity during Pearce activity test .....	58
3.5.4	Bacterial activity in cheese slurry .....	59
3.5.5	Volatilome analysis in cheese slurry samples.....	61
3.6	Discussion .....	64
3.7	Conclusions.....	68
3.8	Acknowledgments .....	68
	<b>Chapitre 4 – Impact de la litière à base de fumier recyclé sur le lait cru et implications pour la qualité microbiologique du fromage.....</b>	<b>70</b>
4.1	Résumé .....	70
4.2	Abstract .....	71
4.3	Introduction.....	71
4.4	Materials and methods .....	73
4.4.1	Selection of herds .....	73
4.4.2	Bulk tank milk sampling.....	73
4.4.3	Enumeration and isolation of heat-resistant bacteria .....	74
4.4.4	Identification of isolates.....	74
4.4.5	Proteolytic enzyme test.....	76
4.4.6	Detection of vancomycin-resistant enterococci .....	76
4.4.7	Pearce activity test.....	76
4.4.8	Statistical analysis.....	77
4.5	Results .....	78
4.5.1	Effect of bedding type on thermoduric and thermoresistant bacteria viable counts in milk .....	78
4.5.2	Proteolytic activity of streptococci and enterococci .....	82
4.5.3	Vancomycin-resistance of enterococci.....	82
4.5.4	Effect of thermoresistant bacteria from RMS in Cheddar manufacture .....	83
4.6	Discussion .....	85
4.7	Conclusions .....	88

4.8	Acknowledgments .....	88
Chapitre 5 – Discussion générale .....	89	
5.1	Dénombrement, identification et typage .....	90
5.2	Inoculant pour l'ensilage .....	92
5.3	Litière de fumier recyclé .....	94
5.4	Le microbiote du lait .....	95
5.5	Perspectives .....	96
5.5.1	De nouveaux inoculants .....	96
5.5.2	Identification d'autres sources de contamination du lait .....	97
5.5.3	Utilisation de ferments d'appoint .....	97
Conclusion générale .....	100	
Bibliographie .....	102	
Annexe A – Matériel supplémentaire du chapitre 2 .....	130	
Annexe B – Matériel supplémentaire du chapitre 3 .....	144	
Annexe C – Matériel supplémentaire du chapitre 4 .....	160	

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1.</b> Métabolisme fermentaire chez différentes bactéries lactiques .....	11
<b>Tableau 1.2.</b> Type de peptidases chez les lactocoques adapté de Fox et al. (2017b).....	17
<b>Tableau 1.3.</b> Principaux composés volatils identifiés dans le cheddar adapté de Singh et al. (2003).....	20
<b>Tableau 2.1.</b> Description des inoculants commerciaux utilisés sur les fermes laitières .....	27
<b>Tableau 2.2.</b> Surnageant acellulaire possédant une activité de type bactériocine contre <i>Listeria ivanovii</i> HPB28, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11, ou <i>Clostridium tyrobutyricum</i> ATCC 25755.....	36
<b>Tableau 2.3.</b> Nombre d'isolats des laits appartenant à une espèce ayant aussi été retrouvée dans un fourrage ou un inoculant commerciaux dans une ferme donnée .....	39
<b>Tableau 2.4.</b> Relation entre les isolats des laits et les isolats des fourrages ou des inoculants commerciaux .....	40
<b>Tableau 3.1.</b> Amorces utilisées pour le PMA-qPCR.....	52
<b>Tableau 3.2.</b> Caractéristiques générales des génomes des bactéries lactiques de la flore secondaire <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 et <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212.....	53
<b>Tableau 3.3.</b> Occurrence des gènes liés à la réponse aux chocs thermiques chaud et froid contenus dans les génomes de <i>Lactoccoccus lactis</i> spp. <i>cremoris</i> SK11 et ATCC 19257, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 et ATCC 11842 et <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212 et ATCC 19417.....	54
<b>Tableau 3.4.</b> Occurrence des gènes liés à la réponse aux stress acide, osmotique et général contenus dans les génomes de <i>Lactoccoccus lactis</i> spp. <i>cremoris</i> SK11, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 et <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212 .....	55
<b>Tableau 4.1.</b> Information sur la production de la litière de fumier recyclé dans les fermes laitières .....	74
<b>Tableau 4.2.</b> Thermorésistance d' <i>Enterococcus faecalis</i> avec une activité protéolytique isolés de laits de réservoir collectés dans des fermes utilisant la litière de paille (straw) ou la litière de fumier recyclé (RMS).	83
<b>Tableau 5.1.</b> Bactéries lactiques isolées de laits après un traitement de pasteurisation (73°C, 16 s) provenant de deux fermes utilisant l'ensilage de graminées ou de légumineuses, ainsi que l'ensilage de maïs .....	93

<b>Tableau A1.</b> Étapes de la PCR multiplex pour l'identification des isolats appartenant au groupe <i>Lactobacillus plantarum</i> basée sur le gène <i>recA</i> .....	130
<b>Tableau A2.</b> Conditions de la PCR multiplex pour l'identification des isolats appartenant au groupe <i>Lactobacillus plantarum</i> basée sur le gène <i>recA</i> .....	130
<b>Tableau A3.</b> Étapes pour le typage par amplification de l'ADN polymorphe (RAPD).....	130
<b>Tableau A4.</b> Conditions pour le typage par amplification de l'ADN polymorphe (RAPD).....	130
<b>Tableau A5.</b> Matières sèches et pH des fourrages .....	132
<b>Tableau A6.</b> Pourcentage des isolats n'étant pas identifiés comme bactérie lactique pour les deux milieux de culture : ABEV agar et MRS agar avec bleu de bromophénol (MRS-BPB). Ils sont identifiés comme <i>Acetobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., cyanobactérie, entérobactérie, <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Kocuria</i> spp., <i>Raoultella</i> spp. et <i>Staphylococcus</i> spp. ....	132
<b>Tableau B1.</b> Aire sous la courbe (moyenne ± erreur type) des composés volatils extraits des caillés modèles non inoculés et inoculés avec <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11 seul et en coculture avec <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 ou <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212 à 0, 6 et 12 jours d'affinage à 30 °C.....	149
<b>Tableau B2.</b> Valeurs de P déterminées par le modèle de régression linéaire de l'effet temps et traitement sur les composés volatils extraits des caillés modèles non inoculés et inoculés avec <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11 seul et en coculture avec <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 ou <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212 à 0, 6 et 12 jours d'affinage à 30 °C .....	158
<b>Tableau C1.</b> Étapes de la PCR multiplex pour l'identification des entérocoques .....	160
<b>Tableau C2.</b> Amorces de la PCR multiplex pour l'identification des entérocoques .....	160
<b>Tableau C3.</b> Conditions de la PCR multiplex pour l'identification des entérocoques .....	161
<b>Tableau C4.</b> Étapes de la PCR pour l'identification de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	161
<b>Tableau C5.</b> Conditions de la PCR pour l'identification de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	162
<b>Tableau C6.</b> Étapes de la PCR multiplex pour la détection de sept types d'entérocoques résistants à la vancomycine.....	162

**Tableau C7.** Amorces de la PCR multiplex pour la détection de sept types d'entérocoques résistants à la vancomycine ..... 163

**Tableau C8.** Conditions de la PCR multiplex pour la détection de sept types d'entérocoques résistants à la vancomycine ..... 163

# Liste des figures

<b>Figure 1.1.</b> Évolution d'un ensilage d'après Dunière et al. (2013) .....	4
<b>Figure 1.2.</b> Procédé général de la fabrication du fromage Cheddar.....	8
<b>Figure 1.3.</b> Arbre phylogénétique de l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S des espèces de <i>Lactobacillus</i> et <i>Pediococcus</i> (Salvetti et al., 2012) .....	10
<b>Figure 1.4.</b> Principaux facteurs déterminant le développement des flaveurs du Cheddar. Adaptée de Lawrence et al. (2004).....	13
<b>Figure 1.5.</b> Voies biochimiques menant à la formation de composés de flaveur. Adaptée de Marilley et Casey, (2004). .....	13
<b>Figure 1.6.</b> Génération des composés de flaveurs par la protéolyse. Adaptée de Singh et al. (2003).....	19
<b>Figure 2.1.</b> Organigramme de l'échantillonnage des fermes et de la quantification, isolement et caractérisation des bactéries lactiques. ....	26
<b>Figure 2.2.</b> Diagramme à moustache des comptes viables de bactéries lactiques sur milieu ABEV agar dans le foin (H), l'ensilage de graminées et/ou de légumineuse (GL) et l'ensilage de maïs qu'ils soient inoculés (I) ou non pour les trois périodes d'échantillonnage : (1) printemps 2015, (2) automne 2015, (3) printemps 2016. Les moyennes avec des lettres majuscules distinctes étaient significativement différentes ( $P < 0.05$ ). Les lignes représentent la médiane et les fins des boîtes représentent le 1 <sup>er</sup> et le 3 <sup>e</sup> quartiles. Les moustaches représentent le 1 <sup>er</sup> quartile - 1,5 * (écart interquartile) et le 3 <sup>e</sup> quartile + 1.5 * (écart interquartile) et les points représentent les observations aberrantes. ....	30
<b>Figure 2.3.</b> Abondance relative des bactéries lactiques isolées A) des fourrages et B) du bassin réfrigérant pour la première (printemps 2015) et deuxième (automne 2015) périodes d'échantillonnage. H : foin; GL: ensilage de graminées et/ou de légumineuses; C: ensilage de maïs; I : ensilage inoculé.....	32
<b>Figure 2.4.</b> Comparaison des bactéries lactiques dans différents fourrages : foin (noir), ensilage de maïs (blanc) et ensilage de graminées et/ou de légumineuses (gris). Le graphique à barres d'erreur étendue représente les bactéries lactiques significativement différentes entre les fourrages au niveau du A) genre et de B) l'espèce. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STAMP. Le test de correction multiple est le « Storey's FDR » .....	33

**Figure 2.5.** Effet de l'inoculation de l'ensilage de graminées et/ou de légumineuses (GL). Le graphique à barres d'erreur étendue représente les bactéries lactiques significativement différentes entre les ensilages inoculés (I) ou non au niveau du genre pour la première (S1 : printemps 2015) et seconde (S2 : automne 2015) périodes d'échantillonnage. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STAMP. Le test de correction multiple est le « *Storey's FDR* ».....34

**Figure 2.6.** Diagramme à moustache des comptes viables de bactéries lactiques sur milieu ABEV agar dans le bassin réfrigérant en fonction du type d'alimentation : le foin (H), l'ensilage de graminées et/ou de légumineuse (GL) et l'ensilage de maïs qu'ils soient inoculés (I) ou non. Les moyennes avec des lettres majuscules distinctes étaient significativement différentes ( $P < 0.05$ ). Les lignes représentent la médiane et les fins des boîtes représentent le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>e</sup> quartiles. Les moustaches représentent le 1<sup>er</sup> quartile – 1,5 \* (écart interquartile) et le 3<sup>e</sup> quartile + 1.5 \* (écart interquartile) et les points représentent les observations aberrantes. ....35

**Figure 3.1.** Perte de viabilité à la suite d'un traitement de chaleur (60 °C, 5 min) chez des souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactiplantibacillus plantarum* exprimé en Δlog (log d'UFC/mL avant traitement – log d'UFC/mL après traitement). Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type. Les moyennes avec des lettres majuscules distinctes étaient significativement différentes ( $P < 0.0001$ ).....58

**Figure 3.2.** Concentrations bactériennes déterminées par comptes viables (ligne pleine) et PMA-qPCR (ligne pointillée) et courbe d'acidification pendant le test de Pearce pour le ferment *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 seule (●) en coculture avec *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 (■) ou *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 (▲) et pour le contrôle sans inoculation (◆). A) comptes de *Lactococcus*, B) compte de Lactobacilli et C) valeur de pH. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type (SE).....59

**Figure 3.3.** Concentrations bactériennes déterminées par comptes viables (ligne pleine) et PMA-qPCR (ligne pointillée) et courbe d'acidification des caillés modèles pour le ferment *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 seule (●), en coculture avec *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 (■) ou *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 (▲) et pour le contrôle sans inoculation (◆). A) comptes de *Lactococcus*, B) compte de Lactobacilli et C) valeur de pH. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type (SE). Les moyennes indiquées avec une astérisque étaient significativement différentes ( $P < 0.001$ ). ....60

**Figure 3.4.** Analyse en composantes principales des composés volatils extraits des caillés modèles non inoculés (◆) ou inoculés avec le ferment *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 seule (●), en coculture avec *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 (■) ou *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 (▲). A) et C) Graphiques des scores; B) et D) Graphique des loadings des trois premières composantes principales.....62

<b>Figure 3.5.</b> Aire sous la courbe (AUC) des composés volatils : A) alcools et phénol, B) aldéhydes, C) cétones, D) ester, E) alcane, et F) alcènes contribuant le plus à la seconde et troisième composantes principales extraits des caillés modèles, affinés pour 0, 6 et 12 jours, non-inoculés et inoculés avec <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11 seule et en coculture avec <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 ou <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type. Pour chaque composé, les moyennes avec des lettres majuscules distinctes étaient significativement différentes ( $P < 0.05$ ) .....	63
<b>Figure 4.1.</b> Profile de température, étapes et points d'échantillonnage (T0-T5) du test de Pearce .....	78
<b>Figure 4.2.</b> Diagramme à moustache des comptes viables des bactéries thermoduriques (spores des aérobies mésophiles, aérobies thermophiles et anaérobies mésophiles) et des bactéries thermorésistantes dans le lait du bassin réfrigérant des fermes utilisant la litière de fumier recyclé (LFR) ou la litière de paille (Straw). Les bactéries thermorésistantes ont été incubées à deux températures différentes, soit 37 °C et 42 °C. Les moyennes avec des lettres majuscules distinctes étaient significativement différentes ( $P < 0.05$ ). Les lignes représentent la médiane et les fins des boîtes représentent le 1 <sup>er</sup> et le 3 <sup>e</sup> quartiles. Les moustaches représentent le 1 <sup>er</sup> quartile – 1,5 * (écart interquartile) et le 3 <sup>e</sup> quartile + 1,5 * (écart interquartile) et les points représentent les observations aberrantes.....	79
<b>Figure 4.3.</b> Pourcentage cumulatif des groupes taxonomiques dans les laits de fermes utilisant la litière de fumier recyclé (RMS) et la litière de paille (Straw) pour A) les bactéries sporulées isolées du lait chauffé à 80 °C pendant 10 min et B) les bactéries isolées sur M17 agar à 37 °C et 42 °C à partir du lait chauffé à 63 °C pendant 10 min.....	80
<b>Figure 4.4</b> Analyse statistique des groupes taxonomiques des bactéries thermoduriques et thermorésistantes isolée du lait de fermes utilisant la litière de fumier recyclé (RMS) en noir et la litière de paille (Straw) en blanc. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STAMP. Le test de correction multiple est le « <i>Storey's FDR</i> ». Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance calculé. A) Comparaison au niveau du genre pour toutes les conditions de culture; B) comparaison au niveau de l'espèce pour la condition anaérobiose; C) comparaison au niveau de l'espèce pour la croissance sur M17 à 37 °C .....	81
<b>Figure 4.5.</b> Comptes viables lors du test de Pearce pour A) <i>Enterococcus faecalis</i> M155, M236 et M390 ou <i>Streptococcus thermophilus</i> M388 thermorésistants et B) le ferment <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11.C) Courbe d'acidification lors du test de Pearce avec le ferment <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11 seul ou en coculture. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type (SE). Les moyennes avec des lettres majuscules distinctes étaient significativement différentes ( $P < 0.05$ ) .....	84

**Figure 5.1.** Compte viable de bactéries lactiques exprimé en Log d'unité formatrice de colonie par g ou mL sur milieu ABEV (arginine, mauve de bromocrésol, extrait de bœuf et vancomycine) et MRS-BPB (MRS avec bleu de bromophénol). Les moyennes significativement différentes sont identifiées avec un astérisque ( $P < 0.01$ ) ..... 91

**Figure 5.2.** Comptes viables avant (T0) et après pasteurisation du lait cru (T1) pour sept fermes utilisant différents types d'alimentation. GL correspond à l'ensilage de graminées et de légumineuses, C à l'ensilage de maïs et H au foin. I correspond à l'ensilage inoculé..... 94

**Figure A1.** Test de diffusion sur gélose avec la souche sensible *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11. A) Les surnageant des cultures de *Lactobacillus fermentum* RKG 1-85 et RKG 1-87 avait un effet inhibiteur pouvant être causé par la production d'acides organiques. B) Le surnageant de la culture de *Lactobacillus plantarum* RKG 1-634 a un effet inhibiteur de type bactériocine. C) Le surnageant de la culture de *L. lactis* ATCC 11454 productrice de la nisine A (identifié comme 9A)..... 131

**Figure A2.** Groupement selon l'association (UPGMA) des bactéries lactiques dont leur origine pourrait être l'ensilage. Le pourcentage de similarité entre les profils de bandes des isolats obtenus par amplification de l'ADN polymorphe (RAPD) a été déterminé par le coefficient de corrélation de Pearson. Inoculant 1 = Biotal Buchneri 500 et Inoculant 2 = Biotal Supersile (Lallemand Animal Nutrition, Milwaukee, WI); Inoculant 3 = 11CFT, Inoculant 4 = 11C33 et Inoculant 5 = 11G22 (Pioneer, Johnston, IA)..... 143

**Figure B1.** Graphique circulaire de la distribution des annotations du génome de *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10. De l'extérieur vers l'intérieur, sont retrouvés les contigs, les séquences codantes sur le brin sens, les séquences codantes sur le brin antisens, les gènes d'ARN, les séquences codantes homologues à des gènes connus de résistance aux antimicrobiens, les séquences codantes homologues à des gènes connus de facteurs de virulence, contenu en GC et le biais de GC. Les couleurs des séquences codantes indiquent la classification des sous-systèmes auxquels ils appartiennent..... 144

**Figure B2.** Graphique circulaire de la distribution des annotations du génome de *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212. De l'extérieur vers l'intérieur, sont retrouvés les contigs, les séquences codantes sur le brin sens, les séquences codantes sur le brin antisens, les gènes d'ARN, les séquences codantes homologues à des gènes connus de résistance aux antimicrobiens, les séquences codantes homologues à des gènes connus de facteurs de virulence, contenu en GC et le biais de GC. Les couleurs des séquences codantes indiquent la classification des sous-systèmes auxquels ils appartiennent ..... 145

<b>Figure B3.</b> Gènes liés à la glycolyse et la gluconéogenèse dans le génome de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 et <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212. A) Diagramme KEGG démontrant les gènes présents dans tous ou certains génomes ou encore absents. B) Carte de fréquentation de l'occurrence des gènes dans les génomes .....	146
<b>Figure B4.</b> Gènes liés à la voie des pentoses-phosphates dans le génome de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 et <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212. A) Diagramme KEGG démontrant les gènes présents dans tous ou certains génomes ou encore absents. B) Carte de fréquentation de l'occurrence des gènes dans les génomes .....	147
<b>Figure B5.</b> Gènes liés au métabolisme du pyruvate dans le génome de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 et <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212. A) Diagramme KEGG démontrant les gènes présents dans tous ou certains génomes ou encore absents. B) Carte de fréquentation de l'occurrence des gènes dans les génomes .....	148
<b>Figure B6.</b> Organisation du locus <i>pIn</i> chez <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212. Les gènes <i>brnQ1</i> et <i>napA1</i> ne font pas partie du locus, mais ils permettent de le délimiter. Chaque couleur représente un opéron. Les gènes en blanc sont des protéines hypothétiques.....	149
<b>Figure B7.</b> A) Extrait des chromatogrammes des composés volatils des caillés modèles inoculés avec <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11 seule et en coculture avec <i>Lactobacillus delbrueckii</i> RKG R10 ou <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212 affinés pendant 6 et 12 jours B) Extrait des chromatogrammes des composés volatils des trois répétitions de caillés modèles inoculés avec <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> SK11 en coculture avec <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RKG 2-212 affinés 12 jours.....	159
<b>Figure C1.</b> Test de l'activité protéolytique sur gélose de lait. Les souches protéolytiques dont <i>Enterococcus faecalis</i> M97 produisent un halo clair.....	164

## Liste des abréviations, sigles, acronymes

(E)	Trans
(Z)	Cis
× g	Unité d'accélération
°C	Degré celcius
µL	Microlitre
A.A.	Acide aminé
ABEV	Milieu agar contenant de l'arginine, du mauve de bromocrésol, de l'extrait de viande et de la vancomycine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
A <sub>w</sub>	Activité de l'eau
bp	Paire de bases
C	Ensilage de maïs
CEP	Protéinase associée à la membrane cellulaire
CI	Ensilage inoculé de maïs
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CSP	Protéine de résistance au froid
d	Jour
DHI	Dairy herd improvement
e.g.	Par exemple
FDR	False discovery rates
g	Gramme
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GL	Ensilage de graminées et/ou de légumineuses

GLC	Ensilage de graminées et/ou de légumineuses et ensilage de maïs
GLCI	Ensilage de graminées et/ou de légumineuses et ensilage inoculé de maïs
GLI	Ensilage inoculé de graminées et/ou de légumineuses
GLICI	Ensilage inoculé de graminées et/ou de légumineuses et ensilage inoculé de maïs
Gy	Gray
h	Heure
H	Foin
HDS	Différence significative honnête
HF	Hétérofermentaire facultif
HM	Homofermentaire
HO	Hétérofermentaire obligatoire
HSP	Protéine de résistance à la chaleur
i.e.	C'est-à-dire
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LAB	Bactérie lactique
LFR; RMS	Litière de fumier recyclé
Log	Logarithme
MIC	Concentration minimale inhibitrice
min	Minute
mL	Millilitre
MLST	Séquençage de gène multilocus
MLVA	Analyse multilocus du nombre de répétitions en tandem polymorphe
mm	Milimètre
MMV	Milieu MRS dont le glucose est substitué par du maltose
MRS-BPB	MRS agar avec bleu de bromophénol
MS	Spectrométrie de masse
mV	Milivolt
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide

NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramme
NSLAB	Flore secondaire lactique
PATRIC	Pathosystems Resource Integration Center
PCA	Analyse de composantes principales
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
pep	Peptidase
PMA	Propidium monoazide
qPCR	PCR quantitative
RAPD	Amplification aléatoire d'ADN polymorphe
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
RKG	Roy, Kennang et Gagnon
rpm	Rotation par minute
s	Seconde
SE	Erreur type
sp.	Espèce non définie
SPME	Microextraction sur phase solide
spp.	Plusieurs espèces d'un genre
ssp.; subsp.	Sous-espèce
U	Unité
UFC; cfu	Unité formatrice de colonie
UPGMA	Groupement selon l'association moyenne
vol/vol	Volume/volume
VBNC	Cellules viables mais non cultivables
VRE	Entérocoque résistant à la vancomycine
wt/vol	Poids/volume

*« La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés. »*

*Louis Pasteur*

# Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les professeurs Denis Roy et Gisèle LaPointe de m'avoir accordé une place au sein de leur équipe de recherche. Ainsi, après mon baccalauréat en biologie, j'ai pu parfaire mes connaissances en microbiologie des produits laitiers, un si passionnant domaine. Mon directeur de recherche Denis Roy a su m'encadrer au bon moment et a m'a laissé la liberté dont j'avais besoin pour devenir une meilleure scientifique. Merci à mon co-directeur de recherche Yvan Chouinard d'avoir pris du temps de m'initier aux pratiques agricoles des fermes laitières et à Robert Berthiaume de s'être joint au projet. Merci à tous les autres chercheurs, dont Charles Goulet et Simon Dufour qui se sont impliqués dans le projet. Je tiens à remercier tous les producteurs laitiers qui nous ont accueillis chez eux et qui nous ont partagés un peu de leur quotidien.

J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire. L'excellente atmosphère de travail m'a motivée tout au long de ma maîtrise et mon doctorat. Merci à Hye-Ji Kang d'avoir été un modèle de doctorante. Merci à Audrey Rivière, une doctorante par excellence et une amie pour la vie. Un énorme merci à Patricia Savard et Émilie Desfossés-Foucault, deux conseillères scientifiques hors pair. Un merci tout spécial à mes stagiaires Camille Labrit, Xavier Plante, Myriam Laberge, Claire Vogel, Mariane Camara, Camille Daunizeau, Halimatou Diallo et Laurie Hamelin. J'espère avoir pu vous aider autant que vous m'avez aidé. Un énorme merci à Marie Verheyde, ma standardiste préférée qui m'a tant aidée pour contacter les producteurs. Merci à Camille Cavestri pour ton brin de folie. Je tiens à remercier mon compatriote de projet Alexandre Kennang pour tout ce qu'on a pu accomplir ensemble. Et tous les autres, merci d'avoir partagé vos connaissances avec moi pour que ce projet soit une réussite.

Il va de soi que je tiens à remercier ma famille et mes amis pour tout le soutien moral apporté. Premièrement, merci à mon père qui s'est toujours intéressé à mon projet et qui m'a transmis sa passion pour les sciences. Merci à ma mère qui s'inquiétait de savoir si je n'avais besoin de rien à Québec. Merci à Mamie Momonne qui m'a toujours démontré sa fierté. Un immense merci à Bernard qui m'a toujours soutenu et qui a fait des sacrifices. Merci à la cagette espagnole étendue et à mes amies pantoufles. À tous, je pourrai enfin répondre à votre question : « Quand est-ce que tu finis ton doctorat ? ».

# Avant-propos

Le présent document constitue une thèse avec intégrations d'articles. Ces derniers dont je suis l'auteure principale ont été soumis à des revues avec comité de lecture et sont rédigés en anglais. Un résumé en français est présenté pour chacun de ces articles. Les tableaux et figures présents dans les articles sont compris dans les listes de tableau et figure. Les références bibliographiques sont quant à elles listées à la fin du document.

Le manuscrit comprend cinq chapitres. Le chapitre 1 présente une revue de littérature résumant en premier lieu les connaissances actuelles sur la production laitière et où deux pratiques de gestions à la ferme possédant une influence sur le microbiote du lait vous seront décrites. Ensuite, les rôles des bactéries lactiques dans la fabrication fromagère avec un intérêt particulier pour le fromage cheddar vous seront présentés. De plus, l'hypothèse et les objectifs de cette thèse vous seront présentés.

Le chapitre 2 dont le titre est : « *Prevalence and abundance of lactic acid bacteria in raw milk associated with forage types in dairy cow feeding* » a été accepté sous forme d'article dans *Journal of Dairy Science* (J. Dairy Sci. 103:5931-5946). Les coauteurs sont : Alexandre Jules Kennang Ouamba, Gisèle LaPointe, Yvan Chouinard et Denis Roy. La base du projet a été élaborée par Dr Denis Roy, Dre Gisèle LaPointe et Dr Yvan Chouinard. Le recrutement des fermes a été réalisé en collaboration avec M. Robert Berthiaume. Les échantillonnages ont été effectués par Alexandre Kennang et moi-même. Le criblage de l'activité antibactérienne a été possible grâce au support du Dr Ismail Fliss et Dr Benoît Fernandez.

Le chapitre 3 dont le titre est : « *Impact of two thermostable non-starter acid lactic bacteria strains on model Cheddar production* » a été écrit sous forme d'article et sera soumis dans un journal scientifique. Les coauteurs sont : Charles Goulet, Gisèle LaPointe, Yvan Chouinard et Denis Roy. La base du projet a été élaborée par Dr Denis Roy, Dre Gisèle LaPointe et Dr Yvan Chouinard. La méthodologie pour l'analyse des composés volatils a été développée par Dr Charles Goulet et son équipe.

Le chapitre 4 dont le titre est : « *Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality* » a été publié en 2020 sous forme d'article dans *Journal of Dairy Science* (J. Dairy Sci. 103:128-140). Les coauteurs sont : Laurie Hamelin, Annie Fréchette, Simon Dufour et Denis Roy. La base du projet a été élaborée par Dr Simon Dufour et Dr Denis Roy. La collecte des échantillons a été réalisée par Mme Annie Fréchette et Mme Caroline Forest. Mme Laurie Hamelin a participé à la réalisation des expériences et M. Alexandre Jules Kennang Ouamba a fourni de l'aide pour les analyses statistiques.

Pour la réalisation des chapitres 2, 3 et 4, j'ai mis au point les protocoles et réalisé les expériences avec le support de stagiaires. J'ai effectué l'analyse des données (tableaux, figures et analyses statistiques) et

l'interprétation des résultats. J'ai rédigé les manuscrits. Dr Denis Roy a apporté ces conseils pendant la rédaction. Les coauteurs des chapitres 2, 3 et 4 ont révisé les manuscrits.

Finalement, le chapitre 5 consiste en une discussion générale présentant les apports méthodologiques et pratiques des résultats obtenus. Des perspectives intéressantes pour de futures études sont aussi discutées.

# Introduction

En raison des accords de libre-échange, les fromages canadiens sont plus que jamais en compétition avec ceux provenant d'autres pays comme ceux de l'Union Européenne. Il est donc primordial pour les transformateurs laitiers d'offrir aux consommateurs des produits de qualité optimale et exempts de défauts organoleptiques (Murtaza et al., 2014). Les consommateurs s'attendent ainsi à un produit dont les flaveurs, c'est-à-dire l'ensemble des odeurs et des saveurs, soient constantes d'une production à l'autre. Tous les fromages sont produits sous le même principe (Fox et al., 2017a). Premièrement, le lait est coagulé et forme un caillé grâce à la présure et l'acidité provenant du ferment lactique. Le caillé obtenu subit par la suite différentes opérations en fonction du type de fromage, comme la cheddarisation pour le Cheddar. Ensuite, le fromage frais est salé, moulé et pressé. C'est après une période d'affinage que le fromage final est obtenu. Lors de cette étape, les flaveurs sont produites et régulées majoritairement par l'ensemble des microorganismes présents (Gobbetti et al., 2018). Cet ensemble est appelé : « microbiote » et peut-être divisé en quatre catégories, soient le ferment lactique, le ferment d'appoint, le ferment d'affinage et la flore secondaire. Le ferment d'appoint et le ferment d'affinage sont facultatifs, tandis que la flore secondaire, contrairement aux ferments, n'est pas ajoutée volontairement. Cette dernière est constituée notamment de bactéries lactiques (LAB) comme les lactobacilles, les pédioocoques et les entérocoques et les streptocoques (Ricciardi et al., 2015; Blaya et al., 2018; Afshari et al., 2020).

La production des flaveurs débute par la dégradation des caséines par le ferment lactique. Lors de l'affinage, la viabilité du ferment lactique des lactocoques homofermentaire diminue et laisse place aux ferments d'appoint et d'affinage, ainsi qu'à la flore secondaire. Ceux-ci peuvent transformer ces peptides en composés organiques volatils (Fox et al., 2017b). Certaines études ont associé des bactéries lactiques comme exemple avec un métabolisme hétérofermentaire à des défauts de flaveurs (Banks and Williams, 2004). Il est donc primordial de s'intéresser à la flore secondaire, comme elle est présente involontairement et qu'elle peut être source de défauts organoleptiques. Comme les pratiques en fabrication fromagère sont de plus en plus optimisées pour limiter la contamination bactérienne, une grande partie de la flore secondaire proviendrait directement du lait cru. Dans le cas des fromages faits de lait pasteurisé ou thermisé comme le fromage cheddar, la flore secondaire serait constituée en partie de bactéries dites thermorésistantes. Certaines bactéries lactiques dont des souches de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* et d'*Enterococcus* ont déjà démontré leur potentiel à résister à la chaleur (Giraffa, 2003; De Angelis et al., 2004; Teles Santos et al., 2016).

Des études ont démontré que l'ensemble de l'environnement de la ferme laitière a un impact sur le microbiote du lait cru (Vacheyrou et al., 2011; Skeie et al., 2019). Il faut donc s'intéresser aux différentes pratiques de gestion à la ferme. Au Québec et au Canada, les vaches laitières sont nourries principalement par

l'ensilage, un fourrage humide de graminées ou de légumineuses conservé par la fermentation lactique en silo. Les bactéries lactiques épiphytes des fourrages suffisent à la fabrication de l'ensilage. Par contre, il est devenu pratique courante pour les producteurs laitiers d'ajouter des inoculants bactériens composés d'une ou d'un mélange de souches de bactéries lactiques (Schmidt and Kung, 2010; Muck et al., 2018a). Les LAB homofermentaires (HM) dont *Pediococcus pentosaceus* et les hétérofermentaires facultatifs (HF) dont *L. plantarum* assurent une baisse rapide de pH, tandis que les hétérofermentaires obligatoires (HO) dont *Lactobacillus bucheri* améliorent la stabilité aérobiose (Dunière et al., 2013). Les ensilages sont parfois soumis à de hautes températures. Les bactéries présentes y sont donc aussi soumises. Comme le niveau de LAB dont des hétérofermentaires est très élevé dans l'ensilage, il s'agit d'une source toute désignée pour apporter des LAB indésirables et thermorésistantes dans le lait cru.

En plus de l'utilisation de l'ensilage, une toute nouvelle pratique de gestion à la ferme pourrait être une source de LAB indésirables et thermorésistantes pour le lait. Il s'agit de l'utilisation de la litière à base de fumier recyclé (Bradley et al., 2018; Fournel et al., 2018). En effet, cette litière pourrait entre autres être un vecteur de bactéries du genre *Enterococcus* et *Streptococcus*, car en plus d'être considérés comme thermorésistants, ils sont associés au microbiote des mammifères (Giraffa, 2003; Rowbotham and Ruegg, 2016). Ils ont d'ailleurs une prévalence élevée dans les produits laitiers et peuvent avoir un impact autant positif que négatif sur le développement des saveurs des fromages (Quigley et al., 2013; Murtaza et al., 2014). L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer l'effet de deux pratiques de gestion à la ferme, soit l'utilisation de l'ensilage et de la litière recyclée à base de fumier, sur le profil des bactéries lactiques du lait cru. De plus, l'implication des bactéries lactiques thermorésistantes dans l'apparition de défauts lors de la fabrication du fromage cheddar sera évaluée.

# Chapitre 1 – Revue de littérature

## 1.1 La production laitière

Il est bien connu que le lait cru, matière première du fromage, a un fort impact à de multiples niveaux sur la qualité de celui-ci, dont la qualité microbiologique (Murphy et al., 2016; Fox et al., 2017c). Le lait cru est un milieu favorable pour les microorganismes en raison de sa forte activité en eau ( $A_w$ ) et son contenu en nutriments (Fox et al., 2017d). Certains groupes taxonomiques sont très abondants, comme les bactéries lactiques (LAB) (Quigley et al., 2013; Tilocca et al., 2020). Kable et al. (2016) ont identifié 29 taxons se retrouvant dans la totalité des 899 échantillons de lait cru prélevés dans des camions-citernes en Californie. Les plus abondants étaient *Streptococcus*, *Staphylococcus*, les Clostridiales et *Pseudomonas*. En Norvège, le lait cru de 45 fermes échantillonées à trois reprises était dominé par *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptococcus* (Skeie et al., 2019). Par contre, comme beaucoup de facteurs tel que les pratiques de gestions à la ferme influencent le microbiote du lait cru, la composition de celui-ci est variable (Vacheyrou et al., 2011; Skeie et al., 2019; Tilocca et al., 2020).

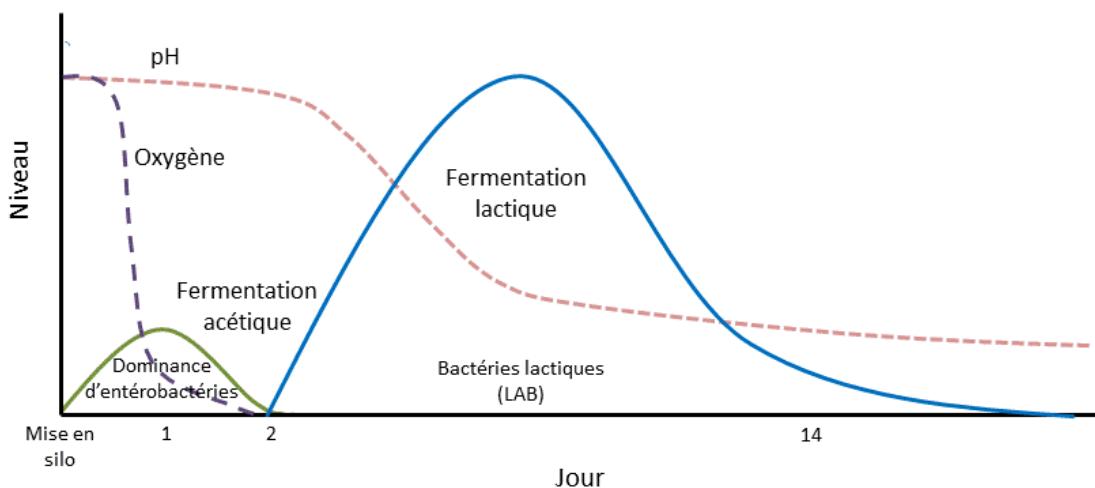
### 1.1.1 Pratiques de gestion à la ferme

La sphère scientifique s'entend pour dire que tout ce qui constitue l'environnement de la ferme peut avoir une incidence sur le microbiote du lait cru (Driehuis, 2013; Doyle et al., 2017; Fox et al., 2017d; Gobbetti et al., 2018). Cela comprend entre autres la localisation de la ferme laitière, les pratiques de traite, l'alimentation des vaches, ainsi que la litière (Doyle et al., 2017; Murphy et al., 2019). Par exemple, Skeie et al. (2019) ont démontré que le nombre de bactéries total dans le lait cru était différent en fonction du système de traite et du type de stabulations utilisées. L'effet de saison a aussi été démontré dans des études sur le microbiote du lait (Buehner et al., 2014; Kable et al., 2016). Le transport de la ferme à l'usine peut aussi avoir un impact d'autant plus que les laits des différentes fermes sont mélangés lors de ce transport (Huck et al., 2008; Darchuk et al., 2015). L'ensilage et la litière, deux éléments des pratiques de gestions à la ferme, seront abordés plus en détail dans les sections suivantes.

#### 1.1.1.1 L'ensilage

L'ensilage est une méthode très commune de conservation des fourrages par voie humide qu'il s'agisse de légumineuses, de maïs ou d'autres graminées (Kalač, 2011; Bernardes et al., 2018). Cette méthode fait appel à la fermentation des sucres des plantes fourragères par les LAB. Ce procédé permet de conserver la qualité et donc la valeur nutritionnelle du fourrage (Grant and Adesogan, 2018). De plus, l'ensilage est très pratique dans des pays boréaux comme le Canada, car il rend disponible le fourrage tout au long de l'année comparativement au pâturage (Wilkinson and Davies, 2013).

Lors de la mise en silo des fourrages, il survient une série de changements biochimiques et microbiologiques (Dunière et al., 2013). Ce sont en fait l'élimination de l'oxygène et la baisse de pH qui modulent les changements microbiens et vice versa (Figure 1.1). En effet, la diminution d'oxygène provient à la fois des plantes elles-mêmes et des microorganismes aérobies qui effectuent de la respiration cellulaire. Lorsque l'oxygène n'est plus présent, les LAB sont favorisées et se mettent à croître, abaissant ainsi le pH. La période de fermentation lactique devrait être complétée en sept à dix jours (Muck et al., 2018b). L'acidité inhibe les microorganismes indésirables, c'est-à-dire les levures, les moisissures, les clostridies et les entérobactéries (Cao et al., 2011; Yitbarek and Tamir, 2014). Les différents genres de LAB retrouvés dans l'ensilage sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Weissella* (Dunière et al., 2013). Du genre *Lactobacillus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis* et *L. buchneri* ont communément été retrouvés dans celui-ci, tandis que d'autres espèces comme *L. acetotolerans*, *L. panis*, *L. reuteri*, *L. taiwanensis* et *L. zae* ont été isolées plus récemment (Rossi et Dellaglio, 2007; Muck, 2013). La composition de ces LAB varie selon le type de fourrage (McAllister et al., 2018).



**Figure 1.1.** Évolution d'un ensilage d'après Dunière et al. (2013)

La stabilité aérobie est très importante pour la qualité de l'ensilage lors d'une exposition de celui-ci à l'oxygène, pendant l'entreposage, en cas d'infiltration ou à la sortie du silo. Dans le cas d'une instabilité de l'ensilage, il y a une recrudescence de moisissures et levures (Tabacco et al., 2009). Ces derniers utilisent comme source d'énergie les acides lactiques et acétiques, ainsi que les glucides solubles. Il en résulte donc une augmentation du pH et de la température (Borreani and Tabacco, 2010; Chen et al., 2013). Cette augmentation de température augmente la perte en matière sèche (Muck et al., 2018b). Dans ces conditions, d'autres microorganismes indésirables sont en mesure de croître. D'ailleurs, Buehner et al. (2014) ont retrouvé pendant la période estivale en moyenne 10,77 log d'unité formatrice de colonie (UFC) de bactéries

thermoduriques par g d'ensilage de maïs. Il s'agissait majoritairement de bactéries sporulées appartenant au genre *Bacillus*. De plus, l'ensilage a été identifié comme une source majeure de contamination de clostridies et de *Listeria monocytogenes* pour le lait cru (Driehuis, 2013). L'utilisation de l'ensilage pour l'alimentation des vaches est d'ailleurs proscrite en Suisse lorsque le lait est destiné à la production de fromage de type suisse pour limiter les spores de *Clostridium tyrobutyricum* pouvant causé des problèmes de gonflements dans le fromage (Fox et al., 2017e). Toutefois, l'effet de l'ensilage sur le profil des LAB du lait est peu connu.

#### 1.1.1.1.1 Les inoculants

Comme mentionné précédemment, une fermentation adéquate des plantes fourragères par les LAB est essentielle pour la qualité de l'ensilage. La quantité de LAB épiphytes peut toutefois être insuffisante pour y arriver. À cet effet, des inoculants bactériens ont été mis sur le marché (Muck, 2013; Muck et al., 2018a) et ceux-ci augmentent la charge en LAB des ensilages (Kung et al., 2007; Schmidt and Kung, 2010). Leur utilisation par les producteurs laitiers est devenue très commune et est même conseillée pour limiter les pertes de matières sèches (Muck et al., 2018b). Ces additifs sont composés soit de souches de LAB HM ou HF, soit de souches de HO ou encore une combinaison des deux. Les inoculants avec des souches HM ou HF sont composés majoritairement de *L. plantarum*, *L. casei*, *Enterococcus faecium* et différentes espèces de *Pediococcus* (Muck, 2013). *L. plantarum* diminue significativement le pH de l'ensilage en augmentant la concentration en acide lactique limitant ainsi rapidement les bactéries indésirables (Broberg et al., 2007; Contreras-Govea et al., 2013). La baisse de pH par les HM ou HF est dépendante du type de fourrage. Par exemple, l'effet de ce type de LAB est important dans le cas des légumineuses, mais n'est pas significatif sur le maïs (Muck et al., 2018a).

L'inoculation peut avoir des bienfaits autres que la diminution rapide du pH. En effet, l'utilisation de souches HO produisant de l'acide acétique augmente la stabilité aérobie, car l'acide acétique a des propriétés antifongiques (Kung et al., 2018). Plusieurs études ont démontré que l'inoculation avec diverses souches de *L. buchneri* seules ou en combinaison avec un HM ou HF diminue le nombre de levures présentes dans l'ensilage comparativement à de l'ensilage non inoculé (Kleinschmit and Kung, 2006; Reich and Kung, 2010; Schmidt and Kung, 2010; Dolci et al., 2011) ou un ensilage inoculé seulement avec un HM ou HF (Ranjit et al., 2002; Hu et al., 2009; Tabacco et al., 2009). *L. buchneri* s'avère un choix d'inoculant d'autant plus intéressant, car une autre voie métabolique lui permet de produire de l'acide acétique. En effet, cette bactérie est en mesure de dégrader une mole d'acide lactique en  $\frac{1}{2}$  mole d'acide acétique et en  $\frac{1}{2}$  mole de 1,2-propanediol et en  $\frac{1}{2}$  mole de CO<sub>2</sub>. Par contre, un minimum de 45 jours d'ensilage est requis pour que la stabilité aérobie soit augmentée par la présence de *L. buchneri* (Muck et al., 2018b). D'autres espèces de HO, comme *L. brevis* ont été testées, mais aucune n'a démontré de meilleurs résultats que *L. buchneri* (Muck et al., 2018a). Outre la stabilité aérobie, des travaux plus récents sur l'utilisation de LAB productrice de bactériocines possédant une activité antibactérienne contre le genre *Clostridium* ont été réalisés (Muck et al., 2018a). Finalement, même si l'impact direct des

inoculants sur l'ensilage est bien connu et décrit, son impact sur la qualité microbiologique du lait ne l'est pas autant.

### 1.1.1.2 Litière

Le choix de la litière est très important pour la qualité du lait sachant que les vaches laitières sont régulièrement en position couchée, le pis en contact avec celle-ci (Derakhshani et al., 2018). Le niveau de contamination bactérienne des trayons est donc influencé par le type de litières (Zdanowicz et al., 2004; Rowbotham and Ruegg, 2016; Wolfe et al., 2018). Doyle et al. (2017) ont d'ailleurs démontré que la surface du trayon était une source importante de contamination du lait cru. Il existe une multitude de matériaux utilisés à titre de litière. La sciure ou raboture de bois, le sable ainsi que la paille sont régulièrement employés (Reich et al., 2010; Smith et al., 2017; Wolfe et al., 2018). De surcroît, des matériaux plus inusités, comme le fumier, peuvent être utilisés.

#### 1.1.1.2.1 Litière à base de fumier recyclé

L'utilisation du fumier à des fins de litière est relativement récente, mais il existe déjà un intérêt pour celle-ci, notamment au Canada (Fournel et al., 2018, 2019a). Les méthodes de fabrication de la litière de fumier recyclé (LFR) ne sont pas standardisées d'une ferme à l'autre, mais le principe demeure similaire. La fraction solide du fumier est obtenue en pressant le fumier à l'aide d'un séparateur, tel qu'une presse à vis, une presse à rouleau ou une centrifugeuse (Fournel et al., 2019b). Une étape de compostage est par la suite réalisée. Lors de cette étape, la fermentation bactérienne augmentera la température de la fraction solide entraînant une modification du microbiote. Il arrive aussi que le compostage est substitué par une digestion anaérobiose. Il existe d'ailleurs sur le marché de la machinerie haute-performance optimisant la séparation du fumier et l'étape de compostage (Leach et al., 2015).

L'utilisation de la LFR représente un risque de contamination microbienne pour le lait cru considérant qu'elle contient des coliformes, des endospores, des levures et des moisissures (Bradley et al., 2014; Sorter et al., 2014; Fournel et al., 2019a). De plus, il est plausible que l'étape de compostage favorise les bactéries thermorésistantes ainsi que les bactéries sporulées considérées comme thermoduriques en raison de la résistance de leurs spores à la pasteurisation. En effet, un haut niveau de spores dans les laits provenant des réservoirs de fermes utilisant de la litière faite de compost (dérivé de biodéchets municipaux triés à la source) a déjà été observé (Driehuis et al., 2014). Les principales bactéries sporulées retrouvées dans le lait appartiennent aux genres *Clostridium* (*C. sporogenes*, *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum*), *Bacillus* (*B. cereus* et *B. sporothermodurans*) et *Geobacillus* (*G. stearothermophilus*). *B. cereus* et *C. tyrobutyricum* sont souvent associés à des défauts de saveurs dans le lait et le fromage respectivement (Quigley et al., 2013). Pour ce qui est des LAB thermorésistantes, la LFR pourrait être source d'*Enterococcus*, car en plus d'être considérées

comme thermorésistantes, elles sont associées au microbiote gastro-intestinal des mammifères. Les entérocoques ont d'ailleurs une prévalence élevée dans les produits laitiers et peuvent avoir un impact négatif sur le développement des saveurs des fromages (Giraffa, 2003). Le genre *Streptococcus* pourrait aussi être véhiculé dans le lait par la LFR. En effet, les études ont démontré que la LFR contient une grande quantité de *Streptococcus* spp. pouvant aller jusqu'à  $10^9$  UFC par g de matière sèche (Sorter et al., 2014; Fournel et al., 2018). De plus, Cole et Hogan (2016) ont démontré qu'à la suite du compostage, les streptocoques sont en mesure de croître dans cette litière. Dans ce groupe, *Streptococcus thermophilus* pourrait causer des problèmes en fromagerie en raison de sa forte activité acidifiante du lait (Shahbal et al., 1991; Dandoy et al., 2011).

## 1.2 La fabrication fromagère

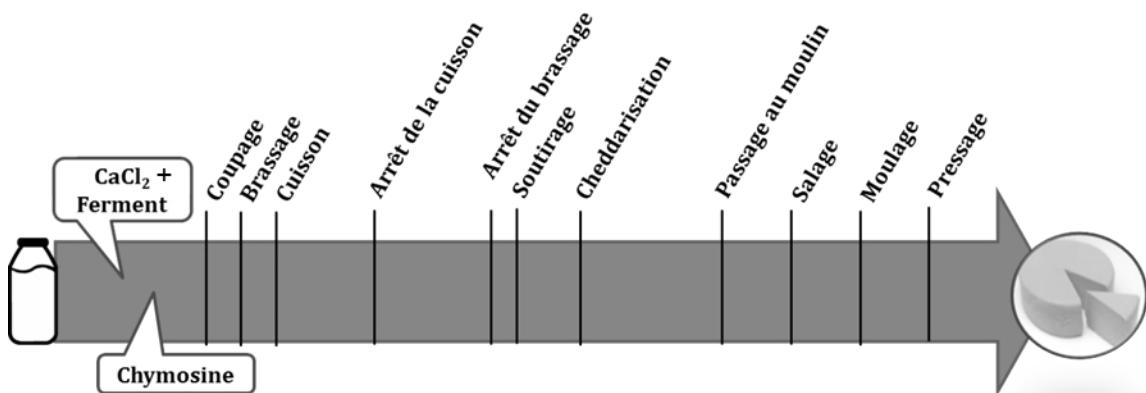
L'invention du fromage remonterait à environ 8000 ans et bien qu'étant un aliment ancestral, il est encore bien présent dans notre alimentation (Bintsis, 2018). La fabrication fromagère consiste à transformer le lait en une matrice solide sous l'action de la chymosine présente dans la présure et des bactéries lactiques (LAB) (Fox et al., 2017f). Par la suite, le drainage du lactosérum est facilité par les étapes de coupage, de brassage et de chauffage. Les divers types de fromages sont obtenus en modifiant les différentes étapes de base de la fabrication et en modifiant les quantités de présures et de ferment (Fox et al., 2017a).

Lorsque le lait cru arrive à la fromagerie, il contient donc une charge bactérienne élevée (Quigley et al., 2011; Kable et al., 2016). Cette charge peut être contrôlée par des traitements thermiques. La pasteurisation et la thermisation sont régulièrement utilisées. La pasteurisation du lait consiste à un chauffage supérieur à 63 °C pour 30 min ou 71,7 °C pour au moins 15 s (Lund et al., 2002). Les populations de bactéries mésophiles et psychrotropes sont réduites, ainsi que les espèces pathogènes comme *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* et *Listeria monocytogenes* (Champagne et al., 1994; Quigley et al., 2013). Les bactéries psychrotropes dont les *Pseudomonas* sont en mesure de croître à basses températures, inférieures à 7 °C (Ercolini et al., 2009). Par contre, la pasteurisation permet l'activation des spores en dormance (Quigley et al., 2013). Buehner et al. (2014) ont retrouvé dans le lait provenant de 10 fermes du Midwest central des États-Unis en moyenne 2,65 log d'UFC de bactéries thermoduriques (bactéries sporulées) par mL de lait. Les bactéries sporulées appartenant au genre *Bacillus* ont majoritairement été mises en cause. De plus, lors de la pasteurisation, les bactéries thermorésistantes comme certaines souches d'entérocoques sont épargnées (McAuley et al., 2012). La pasteurisation permet aussi d'inactiver plusieurs enzymes naturelles du lait comme la lipase et la phosphatase alcaline (Fox et al., 2017d). La thermisation quant à elle consiste à un traitement moins drastique que la pasteurisation. En effet, les populations de lactobacilles sont moins affectées par ce traitement (Desfossés-Foucault et al., 2013). Le chauffage du lait s'effectue à une température environnant 65 °C pendant 10 à 20 secondes (Rasolofo et al., 2010). La thermisation limite les changements provoqués par la

chaleur tout en limitant la détérioration du lait par les bactéries indésirables. En effet, le contrôle des bactéries psychrotropes et mésophiles par la thermisation est comparable à la pasteurisation (Fox and Cogan, 2004). Par contre, le contrôle des pathogènes est moindre (Tilocca et al., 2020). Les traitements à la chaleur ne sont pas en mesure d'inactiver les enzymes thermorésistantes d'origine bactérienne. Ces peptidases et lipases extracellulaires hydrolyses les constituants du lait produisant des problèmes physico-chimiques et des défauts de saveurs. Des psychrotropes du genre *Pseudomonas* et *Serratia*, ainsi que des thermoduriques du genre *Bacillus* sont reconnus pour produire ce type d'enzyme (Huck et al., 2008; Machado et al., 2017).

### 1.2.1 Le cheddar

Le cheddar est d'une grande importance économique au Canada. En effet, près de 174 000 tonnes de cheddar ont été produites en 2018, représentant 34% de la production totale de fromage (Centre canadien d'information laitière, 2019). Ce fromage d'origine anglaise est le premier à être passé d'une production artisanale à une production industrielle (Fox et al., 2017f). Les étapes de la fabrication du Cheddar sont présentées à la figure 1.2. La cheddarisation est une étape clé qui consiste à empiler des blocs de caillé pour faciliter l'expulsion du lactosérum. Cette étape permet d'obtenir un caillé moins friable et plus élastique. Les saveurs, ensemble des saveurs et odeurs, sont principalement développées lors de l'affinage grâce au microbiote du fromage. Cet affinage peut être de quelques mois à quelques années dans le cas du Cheddar (Lawrence et al., 2004; Murtaza et al., 2014).



**Figure 1.2.** Procédé général de la fabrication du fromage Cheddar.

### 1.2.2 Microbiote du fromage

Le microbiote d'un fromage consiste à l'ensemble des microorganismes retrouvés dans celui-ci. Il variera grandement en fonction des types de fromages et des méthodes de fabrication (Fox et al., 2017d; Tilocca et al., 2020). Dans le cas du cheddar, on retrouve presque essentiellement des bactéries lactiques. Elles sont ajoutées

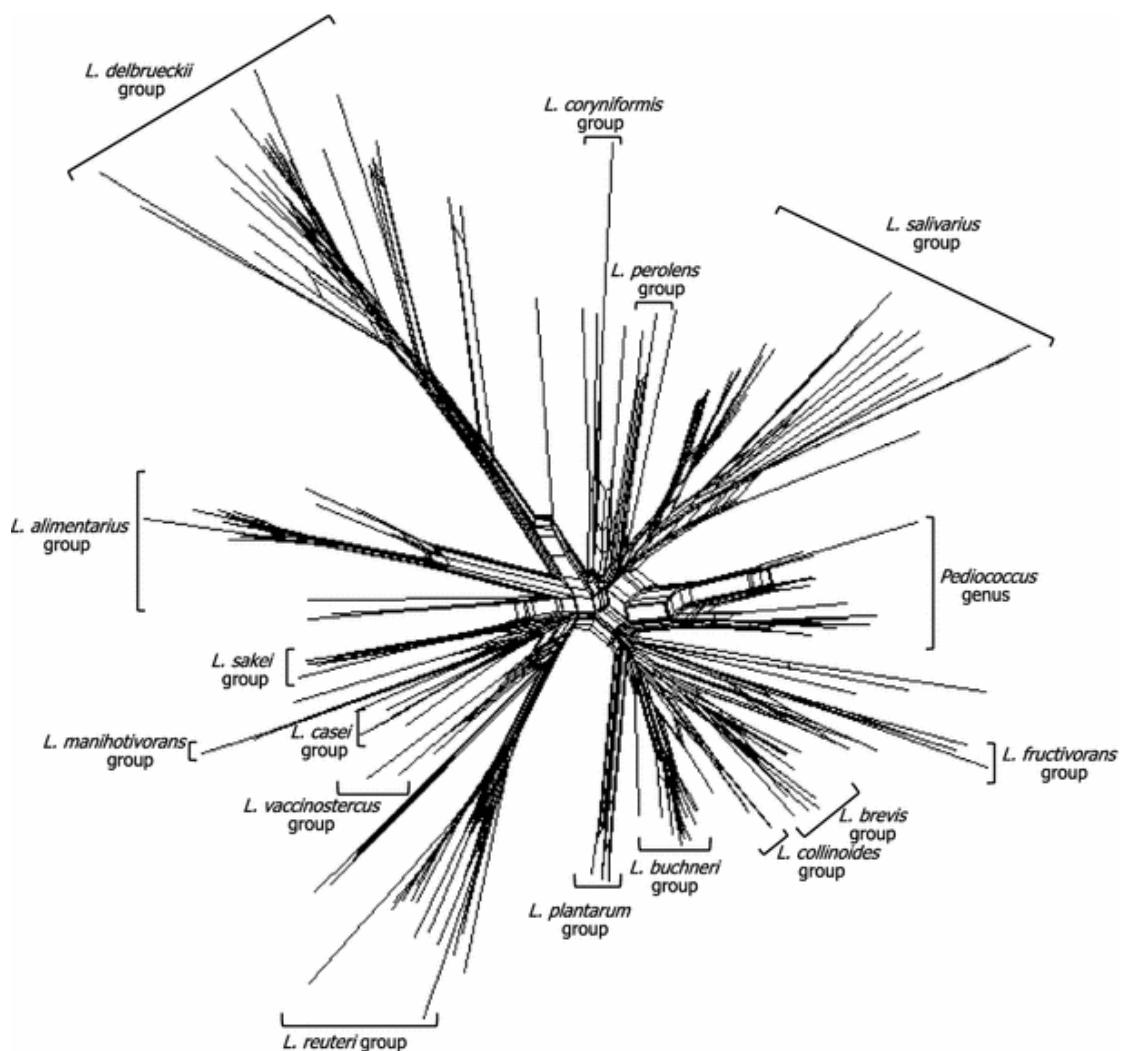
en tant que ferment lactique et parfois en tant que ferment d'appoint. On les retrouve aussi comme flore secondaire (*non-starter lactic acid bacteria* [NSLAB]) (Lawrence et al., 2004). Les bactéries lactiques contribuent au développement des saveurs du fromage, principalement par la fermentation des sucres et par la protéolyse (Bintsis, 2018).

### 1.2.2.1 Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques font l'objet de recherches scientifiques depuis un très grand nombre d'années et l'intérêt des chercheurs pour ce type de bactéries est toujours bien présent. Les LAB appartiennent à l'ordre des *Lactobacillales*. Il s'agit de bactéries Gram positif, oxydase et catalase négative, elles sont non sporulées et le produit principal de leur métabolisme est l'acide lactique (Carr et al., 2002). Cet ordre comprend plusieurs genres bien connus, dont *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*. Le genre *Lactobacillus* est le plus diversifié des LAB (Stefanovic et al., 2017a) et comprend 231 espèces selon « *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* » (Parte, 2018). Les *Lactobacillus* sont aussi considérés comme tolérant aux environnements très acides. Ils peuvent croître jusqu'à un pH de 3 (Salvetti et al., 2012). Avec les nouvelles avancées technologiques, le séquençage du génome des LAB devenu chose courante. Cela a permis de démontrer que chez les LAB, il y a eu une perte de gènes ancestraux et une minimisation des génomes. De plus, les LAB ont démontré une adaptation à leur habitat, ce qui est lié à l'acquisition de gènes par transfert horizontal (Heinl and Grabherr, 2017; Stefanovic et al., 2017a). L'analyse phylogénétique à partir des séquences du gène de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S des *Lactobacillaceae*, en plus de démontrer les transferts horizontaux, a relevé la présence de groupes taxonomiques constitués d'espèces très apparentées (figure 1.3). Plus récemment, une analyse approfondie des génomes de *Lactobacillus* et *Pediococcus* a conduit à une refonte du genre *Lactobacillus* (Zheng et al., 2020). Les espèces qui appartenaient au genre *Lactobacillus* ont été reclassé dans 24 genres différents (cette nouvelle classification sera utilisée dans le chapitre 3).

Les propriétés technologiques des LAB peuvent varier en fonction des espèces, mais aussi en fonction des souches (Taïbi et al., 2011; Bogicevic et al., 2013; Cuffia et al., 2018). Pour cette raison, il y a un grand intérêt pour le typage de souches. Il existe plusieurs techniques principalement basées sur l'analyse génétique des souches, comme le séquençage de gène multilocus (MLST), l'analyse multilocus du nombre de répétitions en tandem polymorphe (MLVA) et l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) (Singh et al., 2009; Matamoros et al., 2011; Ruiz et al., 2014; Gagnon et al., 2015). La MLVA est une technique capable de discriminer des groupes de souches phylogénétiquement proches. L'amplification des tandems polymorphes permet d'obtenir des amplicons dont la taille ou le nombre sont variables d'une souche à l'autre (Matamoros et al., 2011; Dong et al., 2017). Quant au MLST, il est basé sur le séquençage de divers gènes de ménage, généralement au nombre de sept. Les polymorphismes nucléotidiques présents dans les différents gènes sont par la suite analysés (Maiden, 2006; Marsh et al., 2010). Le MLVA et le MLST sont hautement reproductibles et

facilement comparable entre laboratoires avec les bases de données disponibles en ligne. Cependant, des amorces différentes doivent être conçues pour chaque espèce donnée. Le RAPD est une technique intéressante, car elle peut être appliquée de façon identique aux différentes espèces (Ruiz et al., 2014; Teles Santos et al., 2016). En effet, cette technique consiste à utiliser une amorce qui s'hybridera de manière aléatoire sur l'ADN des souches lors de la PCR. Il en résultera ainsi la production de produit PCR de différentes tailles. Ces produits sont migrés par électrophorèse sur gel permettant la visualisation d'un profil qui différera en fonction des souches. En revanche, quand les souches sont phylogénétiquement très proches, il arrive qu'elles ne soient pas différenciées par ce type de méthodes (Singh et al., 2009).



**Figure 1.3.** Arbre phylogénétique de l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S des espèces de *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Salvetti et al., 2012).

Avant ces avancées technologiques en biologie moléculaire, les LAB étaient classées en fonction de leur métabolisme fermentaire (tableau 1.1). Bien que cette caractéristique métabolique soit importante pour la

production d'aliments fermentés, elle n'est pas en lien direct avec la taxonomie des espèces (Salvetti et al., 2012). Les HM sont en mesure de fermenter les hexoses presque exclusivement en acide lactique par la voie métabolique d'Embden-Meyerhof-Parnas, généralement nommée glycolyse. Ces HM possèdent la fructose bisphosphate aldolase, une enzyme clé permettant la fermentation directe du glucose en acide lactique (Gänzle, 2015). Quant aux pentoses et au gluconate, ils ne sont pas fermentés en raison de l'absence de l'enzyme phosphocétolase qui catalyse le xylulose 5-phosphate en acétyle-phosphate et en glycéraldéhyde 3-phosphate (Felis and Dellaglio, 2007). Les HF, lors de la fermentation du glucose, produisent outre l'acide lactique d'autres produits, dont du dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol (Gänzle, 2015). Les HF comme les HM dégradent les hexoses en acide lactique par la glycolyse. De plus, elles sont en mesure de dégrader les pentoses et fréquemment le gluconate, grâce à l'enzyme phosphocétolase (Felis et Dellaglio, 2007). Deuxièmement, les HO emploient la voie des pentoses phosphates (aussi nommée voie du phosphogluconate et hexose monophosphate) en convertissant les hexoses en pentoses. Ensuite, du catabolisme du xylulose 5-phosphate avec l'enzyme phosphocétolase découle une production d'acide lactique, d'éthanol, d'acide acétique et de dioxyde de carbone. Cette voie peut aussi produire des aldéhydes et du diacétyle, deux types de composés participant à la saveur des fromages (Carr et al., 2002). Les pentoses, comme le xylose, peuvent eux aussi être fermentés par la voie des pentoses phosphates (Felis and Dellaglio, 2007).

**Tableau 1.1.** Métabolisme fermentaire chez différentes bactéries lactiques.

Homofermentaire (HM)		Hétérofermentaire facultatif (HF)		Hétérofermentaire obligatoire (HO)	
Espèce	Référence	Espèce	Référence	Espèce	Référence
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	1	<i>Lactobacillus brevis</i>	2
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	1	<i>Lactobacillus casei</i>	2	<i>Lactobacillus buchneri</i>	2
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1
<i>Lactobacillus helveticus</i>	1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	<i>Lactobacillus kefiri</i>	2
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	2
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	2
		<i>Lactobacillus xylosus</i>	1		
		<i>Lactococcus lactis</i>	1		

<sup>1</sup>(Bintsis, 2018)<sup>2</sup>(Muck et al., 2018a)<sup>3</sup>(Fox et al., 2017g)

#### 1.2.2.1.1 Bactéries lactiques utilisées comme ferment

Les bactéries lactiques sont utilisées comme ferment afin de métaboliser le sucre principal du lait, le lactose et donc pour diminuer le pH du lait. Comme le lactose est un disaccharide, une fois transporté à l'intérieur de la cellule, il sera clivé par des hydrolases endocellulaires (Bintsis, 2018). Le ferment lactique peut être défini, c'est-à-dire qu'il est composé d'une ou d'un mélange de souches connues (habituellement des lactocoques mésophiles) ou indéfini lorsque le mélange de souches est inconnu ou encore lorsque le lactosérum d'une production antérieure est incubé et utilisé comme ferment. Les souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* sont les plus utilisées. Quant aux souches de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, elles demeurent moins populaires (Fox et al., 2017g).

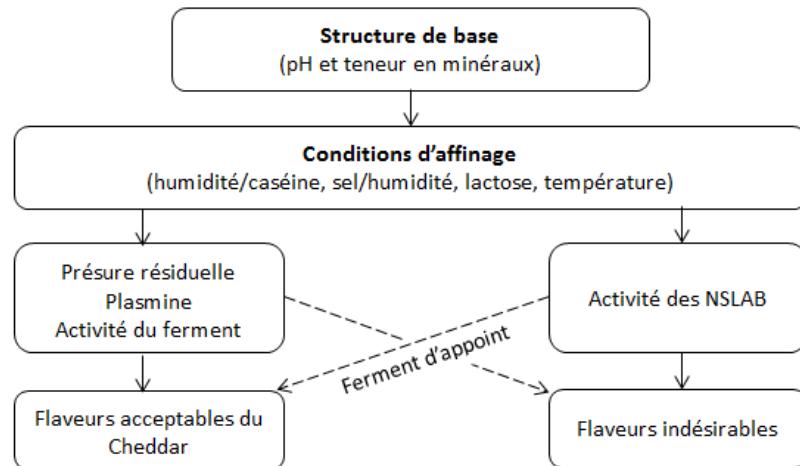
Le ferment lactique contribue aussi à la protéolyse lors de l'affinage du fromage (Fox et al., 2017b). En effet, l'hydrolyse des caséines du lait produira des petits peptides et des acides aminés libres (Bintsis, 2018). Dans un premier temps, ces composés participeront à la saveur du fromage, mais seront aussi catabolisés par les ferment et la flore secondaire pour former d'autres composés volatils contribuant d'autant plus aux saveurs et odeurs du fromage (Karametsi et al., 2014; Fox et al., 2017b). Le choix des sous-espèces (*cremoris* ou *lactis*) de *Lcc. lactis* est très important, car les profils aromatiques obtenus avec celles-ci sont différents. Le génome de *Lcc. lactis* ssp. *cremoris* code pour des voies métaboliques qui lui sont propres produisant ainsi une plus grande diversité de saveurs (Bintsis, 2018).

Les bactéries lactiques du ferment ne sont pas les seules bactéries ajoutées dans la matrice fromagère. En effet, il arrive que les fromagers ajoutent un ferment d'appoint, afin d'améliorer les saveurs du fromage (Gobbetti et al., 2015). L'intérêt d'ajouter un ferment d'appoint consiste à améliorer les saveurs du fromage lors de l'affinage lorsqu'il est fait de lait pasteurisé. Nateghi (2017) a aussi démontré que l'utilisation d'un ferment d'appoint composé de souches de *S. thermophilus*, *L. casei* et *L. helveticus*, seules ou en combinaison a contribué à améliorer la production de composés volatils lors de la production de cheddar réduit en gras. Les qualités sensorielles du cheddar ont aussi été améliorées. Stefanovic et al. (2018) ont quant à eux démontré que l'utilisation des trois souches de *L. paracasei* comme ferment d'appoint permettait d'obtenir des profils de composés volatils différents dans des cheddars âgés de trois mois. Finalement, l'utilisation d'un ferment d'appoint permettrait de limiter le développement de la flore secondaire lors de l'affinage réduisant ainsi le développement de saveurs impropres (Fox et al., 2017e).

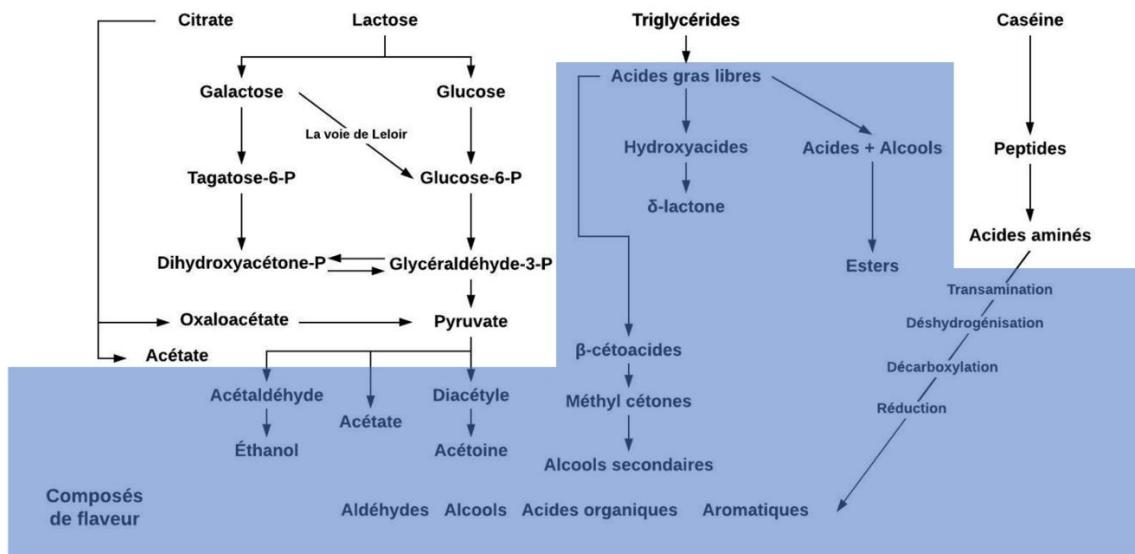
#### 1.2.2.2 Microbiote, affinage et saveurs

Comme mentionné précédemment, une succession de réactions cataboliques se déroule tout au long de l'affinage et les bactéries en sont les catalyseurs. L'affinage est donc contrôlé par différents facteurs modulant ces réactions (figure 1.4). Ces différents facteurs sont applicables au cheddar, mais aussi à la majorité des

fromages (Kilcawley, 2017). Il s'agit d'un processus impliquant à la fois les cellules bactériennes vivantes et mortes. Un équilibre est créé entre les cellules lysées libérant des enzymes intracellulaires et l'activité métabolique des cellules vivantes produisant ainsi les composés déterminant les saveurs du fromage (Smid et al., 2014). Il y a donc trois grands types de réactions qui permettent le développement des saveurs : le métabolisme du lactose résiduel, de l'acide lactique, et du citrate; la lipolyse et le métabolisme des acides gras; et finalement la protéolyse et le catabolisme des acides aminés (Fox et al., 2017b). Ces différentes réactions seront décrites ci-dessous et résumées à la figure 1.5.



**Figure 1.4.** Principaux facteurs déterminant le développement des saveurs du Cheddar. Adaptée de Lawrence et al. (2004).



**Figure 1.5.** Voies biochimiques menant à la formation de composés de saveur. Adaptée de Marilley et Casey (2004).

#### 1.2.2.2.1 Bactéries lactiques de la flore secondaire

Les NSLAB sont présentes dans le fromage sans y être ajoutées. Plusieurs espèces de *Lactobacillus* ont été fréquemment identifiées dans le cheddar, soient *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. parabuchneri*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* et *L. rhamnosus*, ainsi qu'occasionnellement des souches de *Pediococcus* (Quigley et al., 2011; Desfossés-Foucault et al., 2013; Fox et al., 2017e). La présence de celles-ci peut être à la fois positive et négative. En effet, les NSLAB peuvent limiter la croissance des microorganismes indésirables comme certains pathogènes (Christiansen et al., 2010; Montel et al., 2014). En revanche, elles sont généralement plus halotolérantes que les souches du ferment lactique et elles introduisent une variabilité difficilement contrôlable (Singh et al., 2003; Banks et Williams, 2004). Elles peuvent produire des acides aminés et des acides gras modifiant les flaveurs du fromage (McSweeney, 2004; Fox et al., 2017b). Les LAB hétérofermentaires ont d'ailleurs été associées à des défauts de flaveurs dans le cheddar (Banks and Williams, 2004). La production d'amines biogènes, des composés néfastes pour la santé humaine, par les NSLAB peut aussi être problématique (Crow et al., 2001; Santos et al., 2017). Par exemple, Rea et al. (2004) ont démontré que des souches d'*Enterococcus* spp. produisaient de la tyramine durant l'affinage du Cheddar. L'influence des bactéries sur les flaveurs, donc sur les différentes réactions biochimiques, est espèce et souche dépendante (Banks and Williams, 2004; Lawrence et al., 2004; Yee et al., 2014). La provenance des souches a aussi un impact sur la production de composés participant à la flaveur. Alemayehu et al. (2014) ont isolé des souches de lactocoques épiphytes de plantes et ont démontré que les profils de composés volatils produits dans le lait étaient différents des profils obtenus avec des souches contrôles utilisées dans l'industrie fromagère. De plus, les souches isolées de plantes produisaient une plus grande quantité de presque tous les composés volatils détectés. La présence de ce type de NSLAB pourrait participer au déséquilibre de la flaveur du cheddar. Les caillés modèles « *slurries* » recréant l'affinage à une vitesse accélérée de plusieurs types de fromages dont le Cheddar a permis le suivi du développement de flaveur pendant l'affinage associé à des souches individuelles ou en mélange (Lacroix et al., 2010; Desfossés-Foucault et al., 2014; Pogačić et al., 2015, 2016).

Les NSLAB peuvent provenir d'une contamination à l'usine, comme par des biofilms présents sur les installations (Licitra et al., 2007; Chamberland et al., 2017), mais une certaine partie des NSLAB provient du lait de départ (Levante et al., 2017). Ces dernières pour se retrouver dans le cheddar doivent donc résister au traitement de chaleur appliqué au lait. La thermorésistance des LAB est dites souches-dépendantes (Pearce et al., 2012; Teles Santos et al., 2016). Les LAB thermophiles dont *S. thermophilus* sont d'autant plus susceptibles d'être résistantes à la chaleur. Elles sont d'ailleurs utilisés dans la fabrication de produits laitiers lors que des hautes températures (45 °C) sont requises (Prajapati et al., 2017). Les traitements thermiques chez certaines LAB peuvent induire l'état de cellules viables, mais non cultivables (VBNC). Il demeure donc possible pour les bactéries après avoir subi un stress thermique d'augmenter leur population après une certaine période de

récupération (De Angelis and Gobbetti, 2004; Christiansen et al., 2006; Teles Santos et al., 2016). Pour jouer un rôle dans l'affinage, les NSLAB doivent aussi résister aux stress créés lors de la production fromagère. Les bactéries subissent des stress reliés à l'acidité, à l'ajout de sel et aux changements de température (Taïbi et al., 2011). De plus, pendant l'affinage, il y a une compétition entre les différentes espèces retrouvées pour les sources d'énergie. Levante et al. (2017) ont démontré que l'adaptation et la persistance pendant l'affinage du groupe *L. casei* étaient souche-dépendantes. C'est-à-dire que certaines souches persistaient tout au long de l'affinage, tandis que d'autres étaient retrouvées seulement au début. Les comportements des souches face à ces stress peuvent être facilement observables grâce à la production modèle de cheddar comme le test de Pearce et les caillés modèles (Taïbi et al., 2011; Desfossés-Foucault et al., 2014). Le suivi des souches dans ces deux modèles peut être réalisé grâce au dénombrement des cellules viables (cellule cultivable et cellules VBNC) avec une technique couplant le propidium monoazide et la PCR quantitative (PMA-qPCR) précédemment utilisé dans le cheddar (Desfossés-Foucault et al., 2012). Le PMA est un agent intercalant qui se lie à l'ADN sous l'effet de la lumière. Celui-ci se lie à l'ADN libre, mais ne se lie pas à l'ADN des cellules vivantes, car il ne peut pénétrer à l'intérieur de la membrane cellulaire. En revanche, il pénètre dans les cellules mortes lorsque l'intégrité de la membrane cellulaire n'est pas conservée (Fujimoto et al., 2011).

#### 1.2.2.2.2 Métabolisme du lactose résiduel, de l'acide lactique et du citrate

Le cheddar frais, avant l'étape de l'affinage, a un pH de 5,4 et contient entre 0,8 et 1 % de lactose. Pendant l'affinage, le lactose résiduel est utilisé graduellement par le ferment et les NSLAB. La fermentation du lactose peut mener à la production de composés de saveur comme l'acide lactique, l'acide acétique, le diacétyle et l'acétoïne (Gänzle, 2015). Il arrive que la métabolisation du lactose par les NSLAB engendre la racémisation du L-lactate en D-lactate. Le mélange de ces deux isomères est moins soluble que lorsqu'ils sont séparés. La racémisation du lactate provoque donc la précipitation de cristaux de lactate de calcium, ce qui constitue un défaut majeur de texture (McSweeney, 2004; Fox et al., 2017b).

Le citrate n'est pas métabolisé par toutes les LAB et les ferment habituels contenant *L. lactis* ssp. *cremoris* ne sont pas en mesure de le faire. Les espèces de LAB dégradant le citrate comme *L. lactis* ssp. *lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* sont plus habilitées à survivre lors de l'affinage comparativement aux espèces n'utilisant pas le citrate. Le métabolisme du citrate par les *Leuconostoc* produit du diacétyle. De plus, certains lactobacilles mésophiles sont en mesure de cataboliser le citrate en éthanol, acide acétique et acide formique (Fox et al., 2017b).

#### 1.2.2.2.3 Lipolyse et métabolisme des acides gras

La lipolyse permet, entre autres, la libération d'acide gras à courte chaîne dont l'acide butanoïque (butyrique), octanoïque (caprylique) et hexanoïque (caproïque) par l'action de lipases (Aydin, 2017). Ces lipases

proviennent du lait (lipoprotéine lipase), mais aussi du microbiote du fromage. L'activité lipolytique dans le cheddar est plutôt faible et provient majoritairement des lactobacilles et des lactocoques possédant des lipases et des estérases intracellulaires (Fox et al., 2017b). Malgré que cette activité soit faible, elle a une influence sur la flaveur lorsque l'affinage s'effectue sur une longue période (Murtaza et al., 2014). Les acides gras sont convertis en méthyle cétones comme le 2-heptanone, 2-nonanone et 2-undecanone, et en lactones. De plus, les acides gras peuvent interagir avec le méthanethiol pour former du S-méthyl thioesters et avec l'éthanol pour produire des esters d'éthyle. Les acides gras à chaîne courte correspondent à des flaveurs fortes. Contrairement à d'autres fromages comme les bleus, une trop grande quantité d'acides gras libres est un défaut dans le Cheddar, car ceux-ci donnent les notes de ranci (Fox et al., 2017b).

#### 1.2.2.2.4 Protéolyse et catabolisme des acides aminés

La protéolyse est sans contredit un processus très important de l'affinage autant pour la flaveur que pour la texture (fermeté, élasticité, cohésion, fracturabilité, etc.). Comme pour la lipolyse, cette étape est modulée par des enzymes provenant du lait, de la présure et du microbiote du fromage. La chymosine, une des enzymes contenues dans la présure initie la protéolyse de la caséine. Ensuite, les enzymes du ferment (protéinases et peptidases) libèrent des petits peptides et des acides aminés. Les protéinases attachées à la membrane cellulaire clivent les protéines en oligopeptides qui sont ensuite dégradés de façon intracellulaire par les peptidases (Fox et al., 2017b). Les peptides à haute teneur en résidus hydrophobique sont généralement associés à l'amertume, un défaut dans le cheddar. Karametsi et al. (2014) ont identifié cinq peptides amers provenant de la protéolyse de la caséine  $\beta$ . Le niveau d'autolyse des bactéries est donc très important, car la lyse cellulaire facilite l'accès aux peptides pour les enzymes et donc le niveau d'amertume diminuera (Beresford et al., 2001; Savijoki et al., 2006; Blaya et al., 2018). Les protéinases et les endopeptidases ont largement été étudiés et décrits chez plusieurs souches de *Lactococcus lactis* (tableau 1.2). Une étude effectuée sur 109 souches de *Lactococcus* a démontré qu'il y avait des variations de séquences plus importantes chez des gènes impliqués dans la protéolyse (*bcaT*, *pepN* et *pepX*) que dans les gènes de ménages (Rademaker et al., 2007). Outre le ferment lactique, les LAB mésophiles ne semblent pas participer à l'hydrolyse primaire des caséines. Cependant, elles possèdent entre 10 et 30 différentes peptidases contribuant à la libération d'acides aminés (Savijoki et al., 2006). Contrairement aux lactocoques, elles sont toutefois peu connues (Fox et al., 2017b). Čaplová et al. (2018) et Pangallo et al. (2019) ont détecté la présence de gènes codant pour une protéinase associée à la membrane cellulaire *prtP* et deux peptidases (*pepN*, *pepX*) chez différentes espèces de lactobacilles et leur présence est souche-dépendante. Dans le cheddar, peu d'acides aminés libres sont retrouvés contrairement au gouda et à l'emmental. L'acide glutamique, la leucine, l'arginine, la lysine, la phénylalanine et la sérine sont principalement retrouvés (Fox et al., 2017b).

**Tableau 1.2.** Type de peptidases chez les lactocoques adapté de Fox et al. (2017b)

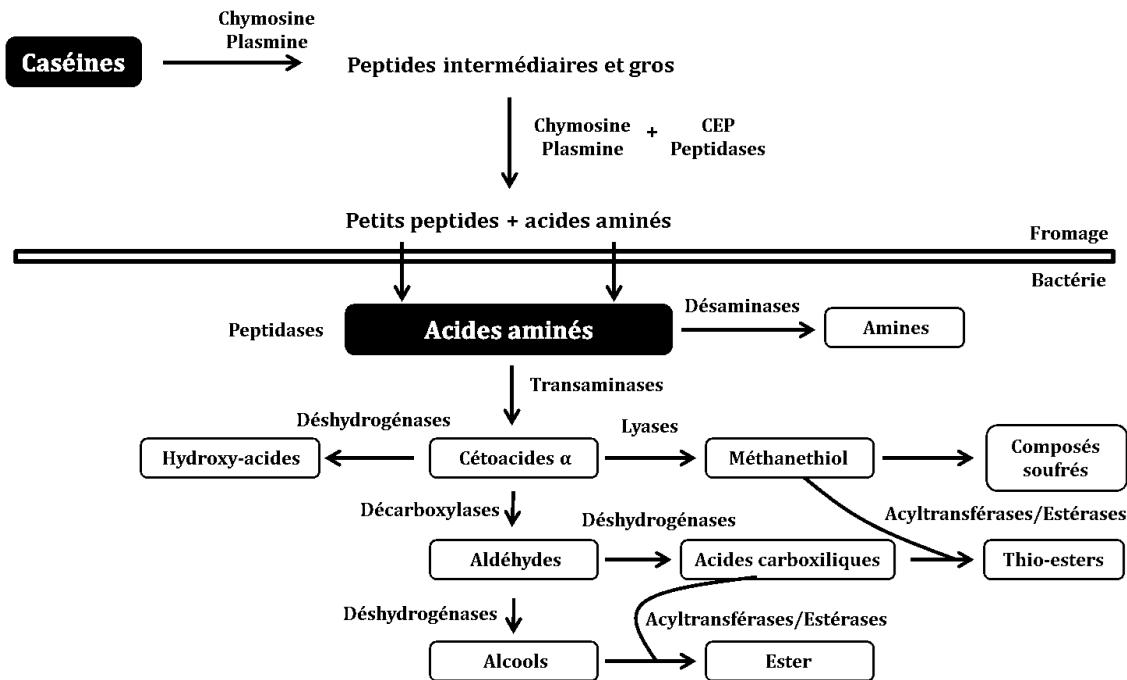
Classe	Code	Fonction
Protéinase associée à la membrane cellulaire (CEP)	P <sub>I</sub>	Dégradation de la β-caséine
	P <sub>III</sub>	Dégradation de la β-caséine et α <sub>s1</sub> -caséine
Types mixtes		7 groupes selon leur spécificité lors de la dégradation du fragment 1-23 de la α <sub>s1</sub> -caséine
Endopeptidases	PepO <sub>1</sub>	Hydrolyse des liens peptidiques dans les fragments de caséines de 30 a.a. et moins
	PepO <sub>2</sub>	
	PepF <sub>1</sub>	
	PepF <sub>2</sub>	
Aminopeptidases	PepN	Spécifique au métalloenzyme
	PepA	Spécifique au thiol-enzyme
	PepC	Spécifique aux résidus N-terminal Glu et Asp
	PepP	Spécifique aux résidus N-terminal Pro
Iminopeptidase	PepI	Relâche les N-terminal Pro
Dipeptidyl aminopeptidases	PepX	Spécifique aux peptides avec une Pro en avant-dernière position.
Pyrolydone carboxylyl peptidase	PCP	Relâche les N-terminal acide pyroglutamique
Tripeptidase	PepT	
Dipeptidases	PepV	Dipeptidase générale
	PepL	Spécifique aux dipeptides et tripeptides avec Leu en N-terminal et aux dipeptidases spécifique au Pro
	PepR	Spécifique aux dipeptides avec Pro en première position
	PepQ	Spécifique aux dipeptides avec Pro en dernière position

a.a. : acide aminé; Glu : acide glutamique; Asp : acide aspartique; Pro : proline; Leu : Leucine

La protéolyse primaire est bien comprise, mais la protéolyse secondaire est quant à elle très complexe et variable (Fox et al., 2017b). Selon Fox et al. (2017g), les efforts en recherche devraient être concentrés sur le catabolisme des acides aminés. Les acides aminés libres peuvent être associés directement à différentes saveurs, mais sont surtout des précurseurs de plusieurs composés de saveurs produits par différentes réactions (Figure 1.5). Une fois les acides aminés libérés dans la pâte du fromage, ils continuent d'être dégradés en différents composés volatils. Il existe une certaine coopération entre les bactéries du ferment lactique et les NSLAB dans la formation de ces différents composés. D'ailleurs, il a été démontré que la présence de *L. lactis* ssp. *cremoris* SK11 a eu un impact sur l'expression de gènes liés à la dégradation des protéines, des peptides et des acides aminés d'une souche de *L. paracasei* (Desfossés-Foucault et al., 2014). Les NSLAB dont les lactobacilles assurent entre autres la conversion des acides aminés en cétoacides et hydroxyacides, tandis que les lactocoques convertissent ces derniers en acides (Murtaza et al., 2014). De manière plus détaillée, les aminotransférases provenant du ferment lysé sont très importantes, car elles initient le catabolisme des acides aminés en transférant le groupement NH<sub>2</sub> sur un cétoacide accepteur (Smit et al., 2005; Fox et al., 2017b). L'a-cétoglutarate issu du glutamate est le cétoacide accepteur le plus performant. Les lactobacilles sont fréquemment en mesure de former *in situ* de l'a-cétoglutarate, grâce à la glutamate déshydrogénase (Smit et

al., 2005). L'enzyme BcaT, retrouvée chez les lactocoques, participe à la conversion des acides aminés à chaîne latérale ramifiée comme la leucine en précurseurs de composés volatils. La présence de cette aminotransférase a aussi été détectée chez différentes souches de lactobacilles (Čaplová et al., 2018; Pangallo et al., 2019). Les cétoacides  $\alpha$  sont instables et sont convertis en une panoplie d'autres composés, dont des hydroxyacides et des aldéhydes. Les aldéhydes sont convertis par la suite en acides carboxyliques et en alcool (Fox et al., 2017b). Des espèces de lactobacilles (*L. helveticus* et *L. casei*) ont été identifiées comme participant au catabolisme de la phénylalanine, la tyrosine, et le tryptophane par transamination et déshydrogénéation. La dégradation de la phénylalanine produit de l'acide phényllactique et phénylacétique, ainsi que de l'acide benzoïque, tandis que celle de la tyrosine produit de l'acide hydroxy phényllactique et l'acide p-hydroxy phénylacétique. Quant au tryptophane, il peut être dégradé en acide indole-3-pyruvique, puis converti en acide indole-3-acétique. Certaines espèces de lactobacilles convertissent ce dernier en scatole, un composé pouvant correspondre à des saveurs impropres (Singh et al., 2003).

La décarboxylation et la désamination sont deux autres voies importantes du catabolisme des acides aminés. Premièrement, lors de la décarboxylation, l'acide aminé est transformé en amine primaire par la perte du CO<sub>2</sub>. On dénote aussi la présence d'amines secondaires et tertiaires, mais les mécanismes sont peu connus. *L. casei* a été associé à la décarboxylation de cétoacides à chaîne latérale ramifiée. Les aldéhydes produits correspondent à des arômes de malt et de chocolat (Smit et al., 2005). Deuxièmement, lors de la désamination, il y a production d'ammoniaque. Cette désamination peut aussi avoir lieu à partir d'amines créant des aldéhydes. Il arrive aussi que la chaîne latérale des acides aminés soit modifiée. Par exemple, l'hydrolyse complète de l'asparagine et la glutamine ou l'hydrolyse partielle de l'arginine libère de l'ammoniaque. L'hydrolyse d'un lien carbone-carbone de la tyrosine et du tryptophane peut générer du phénol et de l'indole (Fox et al., 2017b). Les composés soufrés proviennent quant à eux principalement du catabolisme de la méthionine (Blaya et al., 2018). Trois lyases peuvent être impliquées dans le processus soit la cystathionine- $\gamma$ -lyase, cystationine- $\beta$ -lysase et la méthionine- $\gamma$ -lyase (Fox et al., 2017b). La présence du gène *clt* codant pour une cystathionine lyase chez certaines souches de *L. casei* a augmenté la présence de composés volatils soufrés lors de l'affinage (Bogicevic et al., 2013). La participation des lyases produit de l' $\alpha$ -cétobutyrate, de l'ammoniaque et du méthanethiol (Figure 1.6). Le méthanethiol est très réactif et se transforme facilement en disulfure de diméthyle et en trisulfure de diméthyle (Singh et al., 2003; McSweeney, 2004; Smit et al., 2005).



**Figure 1.6.** Génération des composés de flaveurs par la protéolyse. Adaptée de Singh et al. (2003).

#### 1.2.2.2.5 Flaveur du cheddar

Même si les préférences en matière de flaveur peuvent varier entre les consommateurs de Cheddar (Caspia et al., 2006), la constance dans un même produit est primordiale (Kilcawley, 2017). Il existe donc depuis longtemps un intérêt pour la caractérisation des flaveurs du cheddar et celles-ci sont en grande partie attribuées aux composés volatils produits par le ferment et les NSLAB (Kilcawley, 2017). La chromatographie en phase gazeuse (GC) combinée à l'olfactométrie a permis d'identifier certains composés de flaveurs clés dans le cheddar, comme le diacétyle correspondant à un arôme de beurre (Smit et al., 2005). Au fil des avancées technologiques, une multitude de composés (plus de 200) contribuant à la flaveur ont été identifiés (O'Riordan and Delahunty, 2003; Singh et al., 2003), comprenant des acides, des alcools, des aldéhydes, des cétones et des composés soufrés et phénoliques (tableau 1.3). La flaveur du cheddar résulte donc de la combinaison équilibrée de composés volatils qui individuellement ne reflètent pas l'odeur générale de celui-ci (Murtaza et al., 2014; Kilcawley, 2017). Leur caractérisation permet de mieux comprendre les flaveurs propres au cheddar et de les associer aux préférences des consommateurs, ainsi que de mieux comprendre les défauts de flaveurs et leurs sources. De plus, la quantité des composés volatils est aussi importante que la présence ou l'absence de certains de ces composés. Plusieurs composés soufrés, comme le sulfure d'hydrogène, le sulfide de diméthyle et le méthanethiol ont rapidement été identifiés comme des composés clés de l'arôme du Cheddar (Manning

and Robinson, 1973). Par contre, ils n'intensifient pas nécessairement la flaveur, mais ils sont de bons indicateurs de la qualité de celle-ci (Lawrence et al., 2004).

Afin de pouvoir évaluer le profil de composés volatils du fromage, ces derniers sont habituellement séparés par chromatographie en phase gazeuse et leur identification est faite par la suite par spectrométrie de masse (MS). Cependant, les méthodes d'extraction des composés volatils varient. La microextraction sur phase solide (SPME) de l'espace de tête est la plus employée (Milosavljević et al., 2012; Iwasawa et al., 2014; Gómez-Torres et al., 2015; Mentana et al., 2016; Sádecká et al., 2016). Cela consiste à mettre un échantillon de fromage dans un flacon et sous l'effet de la chaleur, les composés volatils sont libérés et captés par une fibre placée dans l'espace de tête du flacon. La SPME est une technique d'extraction passive et des biais peuvent survenir en fonction de la polarité des composés. De plus, la désorption des composés captés par la fibre est faite à haute température (<250 °C) (Kilcawley, 2017) Par contre, d'autres méthodes de microextraction de l'espace de tête comme celles avec trappe intégrée peuvent être utilisées (Pogačić et al., 2015) ou encore, l'utilisation d'un flux d'air continu pour piéger les composés volatils dans une fibre (Goulet et al., 2012).

**Tableau 1.3.** Principaux composés volatils identifiés dans le cheddar adapté de Singh et al. (2003)

Composé volatil	Flaveur	Composé volatil	Flaveur
Acétaldéhyde	Sucré, âcre	Indole	Boule à mites
Acide acétique	Vinaigre	Isobutanol	-
Acétone	-	Isohexanal	-
Acétophénone	Amande, moisie, colle	Limonène	Citronné
β-Angicalactone	-	Linalool	Sucré, floral, miel
Benzaldéhyde	Amande	Méthanethiol	Chou, chou bouilli, soufre
Butanal	Âcre	Acétate de méthyle	-
n-Butanol	Floral, parfumé, fruité, sucré	Propionate de méthyle	-
2-Butanol	Alcool	Hexanoate de méthyle	Ananas
2,3-Butanediol	Fruité	2-Méthyle butanal	Chocolat noir, malt
2-Butanone	Éthérique	3-Méthyle butanal	Chocolat noir, malt
2,3-Butanedione (Diacétyle)	Beurre	2-Méthyle-1-butanol	Vin
Acétate de n-butyle	Poire	3-Méthyle-1-butanol	Fruité, alcool, solvant, grain
Acide n-butanoïque	Moite, fromagé, fécal	3-Méthyle-2-butanone	Camphre
Acétate de 2-butyle	-	Acide 3-méthylbutanoïque (Acide isovalérique)	Fromage suisse, cireux, moite, vieux bas, fécal
Butyrate de n-butyle	-	3-Méthyle-2-pentanone	-
p-Crésol	Impropre, médicinal, vache, basse-cour	2-Méthyl propanal	Malt
(E)-β-Damascenone	Compote de pomme	3-(Méthylthio) propanal (Methional)	Pomme de terre cuite/bouillie
Décanal	Savon, fleuri	Nonanal	Vert
Acide n-décanoïque	Rance	(E)-2-Nonenal	Vert, gras

(E,E)-2,4-Décadienal	Mayonnaise, pain, gras, suif, fruité	(Z)-2-Nonenal	Vert
(E,Z)-2,4-Décadienal	Mayonnaise, pain, gras, suif, fruité	(E,Z)-2,6-Nonadienal	Melon, concombre
Sulfide de diméthyle	Chou, soufré	(E,E)-2,4-Nonadienal	Savon
Disulfide de diméthyle	Oignon, soufré	2-Nonanone	Vert, terreux, fromage bleu, gras, fruité, moisi, vernis
Trisulfide de diméthyle	Chou, ail, soufré	(Z)-1,5-Octadien3-one	Vert, métallique
Tetrasulfide de diméthyle	Putride, chou, soufré	δ-Octalactone	Fruité, pêche, sucré
γ-Decalactone	Noix de coco	Acide n-octanoïque	Odeur corporelle, moite
δ-Decalactone	Pêche, noix de coco	Octanal	Vert, gras, savon, fruité, pelure d'orange
δ-Dodecalactone	Fromagé, noix de coco	2-Octanol	Champignon, noix de coco, huile, rance
6-(Z)-Dodécenyle-γ-lactone	Savon	2-Octanone	Floral, fruité, savon, cétone, moisi
trans-4,5-Époxy-2-(E)-décanal	Métallique	1-Octen-3-one	Champignon
Éthanol	Alcool	2,4-Pentanediol	-
2-Éthyl butanol	-	Acide n-pentanoïque	Fromage suisse
Acétate d'éthyle	Fruité, solvant, sucré	Pentanal	Acre, amande
Propionate d'éthyle	Fruité	2-Pentanol	Sucré, alcool, fruité, noix
Butyrate d'éthyle	Gomme balloune, fruité	Pentan-2-one	Acétone, sucré, fruité, cétone
Hexanoate d'éthyle	Fruité	Phénylacétaldéhyde	Rose
Octanoate d'éthyle	Fruité	Acide phénylacétique	Fleuri
Furanone, 1-5-diméthyle-3-hydroxy-2(5H)-(Sotolon)	Curry, assaisonnement	2-Phényléthanol	Rose
Furanone, 2,5-diméthyle-4-hydroxy-3(2H)-(Fuaneol)	Sucré, caramel, sucre brûlé	α-Pinene	Pin
Furanone, 2-éthyle-4-hydroxy-5-méthyle-3(2H)-(Homofuaneol ou éthyl furaneol)	Caramel	Acide propionique	Âcre
Géosmine	Terreux, sol humide	n-Propanol	Âcre
Guaiacol	Fumé, épice	Propanal	Solvant
Heptanal	Gras, huileux, vert	Acétate de propyle	-
2-Heptanone	Fromage bleu, fruité, moite, savon	Butyrate de n-propyle	Ananas
(Z)-4-Heptenal	Crèmeux, biscuit	Propenal	-
n-Hexanal	Vert	2-Acétyle pyrazine	Pop-corn
n-Hexanol	Gras, floral, vert	2-Isobutyle-3-méthoxy-pyrazine	Poivron, vert
Acide n-hexanoïque	Chèvre	2-isopropyle-3-méthoxy-pyrazine	Terreux, sol, vert, haricot
2-Hexanone	Fruité, cétone	2-Acétyle-1-pyrroline	Rôti
Hexanethiol	Soufre	Skatole	Improphe, boule à mites, fécal
2-Hexanal	Amande, amer, vert, gras	2-Acétyle-2-thiazoline	Rôti
1-Hexen-3-one	Légume cuit, plastique	Thiophen-2-aldéhyde	-
Sulfide d'hydrogène	Oeuf pourri, chou	2-tridécanone	-
3-Hydroxy-2-butanone (Acétoïne)	Beurre	2-Undecanone	Floral, fruité, vert, moisi, suif

## **1.3 Hypothèse et objectifs**

### **1.3.1 Hypothèse générale**

Les pratiques de gestion à la ferme comme l'ensilage et l'utilisation de litière recyclée à base de fumier ont un impact sur la présence de bactéries lactiques thermorésistantes dans le lait cru qui peuvent perturber la fabrication et la maturation du fromage cheddar.

### **1.3.2 Hypothèses spécifiques**

- Les bactéries lactiques de l'ensilage peuvent être transférées au lait cru et ce transfert est exacerbé lorsque l'ensilage est traité avec des inoculants commerciaux.
- Les bactéries lactiques hétérofermentaires de la flore secondaire associées à l'ensilage sont thermorésistantes et produisent des défauts lors de la fabrication du cheddar.
- L'utilisation de la LFR influence les LAB thermorésistantes retrouvées dans le lait cru et qui conséquemment affecte la fabrication du fromage cheddar.

### **1.3.3 Objectif général**

L'objectif général est d'évaluer l'impact des LAB thermorésistantes associées à l'utilisation de l'ensilage et de LFR sur la qualité microbiologique du lait cru et sur la production du fromage cheddar.

### **1.3.4 Objectifs spécifiques**

- Déterminer l'impact de différents fourrages sur les profils de LAB du lait cru et caractériser les LAB provenant des fourrages se retrouvant dans le lait cru par une approche polyphasique.
- Déterminer les comportements de différentes souches de NSLAB isolées du lait provenant de vaches nourries à l'ensilage lors de la production du fromage cheddar, ainsi que leurs effets sur les qualités organoleptiques de celui-ci.
- Évaluer l'impact de l'utilisation de la LFR sur la présence de LAB thermorésistantes dans le lait et déterminer leur comportement lors de la production de fromage cheddar.

# **Chapitre 2 – Prévalence et abondance des bactéries lactiques dans le lait cru associées aux types de fourrage utilisés dans l'alimentation de la vache laitière**

## **Prevalence and abundance of lactic acid bacteria in raw milk associated with forage types in dairy cow feeding**

Mérilie Gagnon,<sup>1,2</sup> Alexandre J. K. Ouamba,<sup>1,2</sup> Gisèle LaPointe,<sup>2,3</sup> P. Yvan Chouinard,<sup>2,4</sup> Denis Roy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Département des sciences des aliments, Laboratoire de génomique microbienne, Université Laval, 2440 boulevard Hochelaga, Québec G1V 0A6 Canada

<sup>2</sup>Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op<sup>+</sup>Lait), 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe J2S 2M2 Canada

<sup>3</sup>Department of Food Science, University of Guelph, 50 Stone Road E, Guelph N1G 2W1 Canada

<sup>4</sup>Département des sciences animales, Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec G1V 0A6 Canada

### **2.1 Résumé**

Les bactéries lactiques (LAB) retrouvées dans le lait cru peuvent être la cause de défauts organoleptiques dans le fromage. Afin d'identifier l'origine de ces LAB pouvant potentiellement se développer pendant la fabrication fromagère, la prévalence et l'abondance de celles-ci ont été évaluées dans le lait associé à différents types de fourrage utilisés dans l'alimentation de la vache laitière. Les fourrages et le lait cru du bassin réfrigéré ont été échantillonnés trois fois sur 24 fermes utilisant soit le foin (contrôle), l'ensilage de graminées et/ou de légumineuses avec l'addition ou non d'ensilage de maïs. Les deux types d'ensilages étaient non-inoculés ou inoculés avec des additifs commerciaux contenant au moins une souche de *Lactobacillus buchneri* seule ou en combinaison avec *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* ou *Pediococcus pentosaceus*. Les résultats indiquent que le compte viable de LAB (2.56 log UFC/mL) dans les échantillons de lait ne différait pas en fonction du type de fourrage utilisé. Au total, 1239 LAB ont été isolées et identifiée par le séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S. Bien que l'inoculation de l'ensilage augmente l'abondance de lactobacilles de 35%, aucun effet sur le profil de LAB des laits n'a été observé. En effet, il n'y avait pas de différence significative dans la prévalence et l'abondance des LAB du lait en fonction du type de fourrage utilisé ( $P > 0.05$ ). De surcroît, les isolats appartenant au groupe taxonomique de *L. buchneri* ont

rarement été retrouvé dans le lait cru (3/481 isolats). Le typage par l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe de 406 isolats a révélé un transfert plausible de souches provenant de l'ensilage jusqu'au lait (~6%). Donc, le fourrage est une source mineure de contamination de LAB pour le lait.

## 2.2 Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) found in milk can be responsible for organoleptic defects in cheese. To identify sources of LAB that could potentially develop during cheese making, we evaluated their prevalence and abundance in milk according to the type of forage used in dairy cow feeding. Forages and bulk tank milk were sampled three times on 24 farms using either hay alone (control), or grass or legume silage supplemented or not with corn silage. Both types of silages were either non-inoculated or inoculated with commercial preparations containing at least a *Lactobacillus buchneri* strain along with *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, or *Pediococcus pentosaceus*. Our results indicate that LAB viable counts in milk samples (2.56 log cfu/mL) did not differ according to the type of forage used. A total of 1,239 LAB were isolated and identified by partial 16S rRNA gene sequencing. Although inoculation increased lactobacilli abundance in grass silage by 35%, we did not observe an effect on the LAB profile of milk. Indeed, there was no significant difference in milk LAB prevalence and abundance according to the type of forage ( $P > 0.05$ ). Moreover, isolates belonging to the *L. buchneri* group were rarely found in bulk tank milk (3 out of 481 isolates). Random amplified polymorphic DNA typing of 406 LAB isolates revealed the plausible transfer of some strains from silage to milk (~6%). Thus, forage is only a minor contributor to LAB contamination of milk.

## 2.3 Introduction

Raw milk is a complex matrix favorable to the development of microorganisms due to its high nutrient content and water activity. The milk microbiota is composed of diverse microorganisms including fungi, bacteriophage, protists, archaea, and bacteria. Lactic acid bacteria (LAB) are one of the most common types of microorganisms in milk (Quigley et al., 2013). They are gram-positive, oxidase- and catalase-negative, asporogenous, and belong to the order of *Lactobacillales* (Mattarelli et al., 2014). Many genera of LAB such as *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* are well-known because they are associated with the manufacturing of dairy products (Gobbetti et al., 2018). Non-starter LAB (NSLAB) found in cheese can come directly from the milk (Desfossés-Foucault et al., 2013; Fox et al., 2017e; Gobbetti et al., 2018). Indeed, they can resist heat treatment of milk before cheese making (Fox et al., 2017a). Heterofermentative NSLAB are occasionally responsible for cheese defects (Banks and Williams, 2004; Ortakci et al., 2015). Moreover, LAB are usually able to produce bacteriocins against closely related bacteria (Field et al., 2018). If NSLAB inhibit starters and adjunct cultures during cheese manufacturing, it could cause defects in end products. Hence, it is essential to have a better understanding of the origin of NSLAB.

The origins of milk microbiota has been the subject of several recent scientific studies (Driehuis, 2013; Gleeson et al., 2013; Skeie et al., 2019). It seems that all components of the dairy farm environment, such as litter, milking systems, and cattle feeding influence this microbiota. In eastern Canada, silage is a key element for feeding dairy cows (Fadul-Pacheco et al., 2017) and it is a potential contamination source of LAB for milk. Silage is obtained by fermentation of forage in bunkers or silos by epiphytic LAB. The composition of these LAB is modulated by silage crops (McAllister et al., 2018). Silage in eastern Canada endures a wide range of temperature and potentially could select for LAB able to resist heat treatment in milk. In recent years, it has become common practice to add bacterial inoculants to silage to improve its quality during storage. Facultative heterofermentative LAB such as *Lactobacillus plantarum* or obligate heterofermentative LAB such as *Lactobacillus buchneri* are often used (Muck et al., 2018a). The *L. buchneri* inoculant is beneficial, as this species decreases yeast numbers in silage through a high production of acetic acid (Dolci et al., 2011). Although the effects of inoculants on silage quality are well described (Schmidt and Kung, 2010; Tabacco et al., 2011; Contreras-Govea et al., 2013), their direct influence on milk microbiota is not.

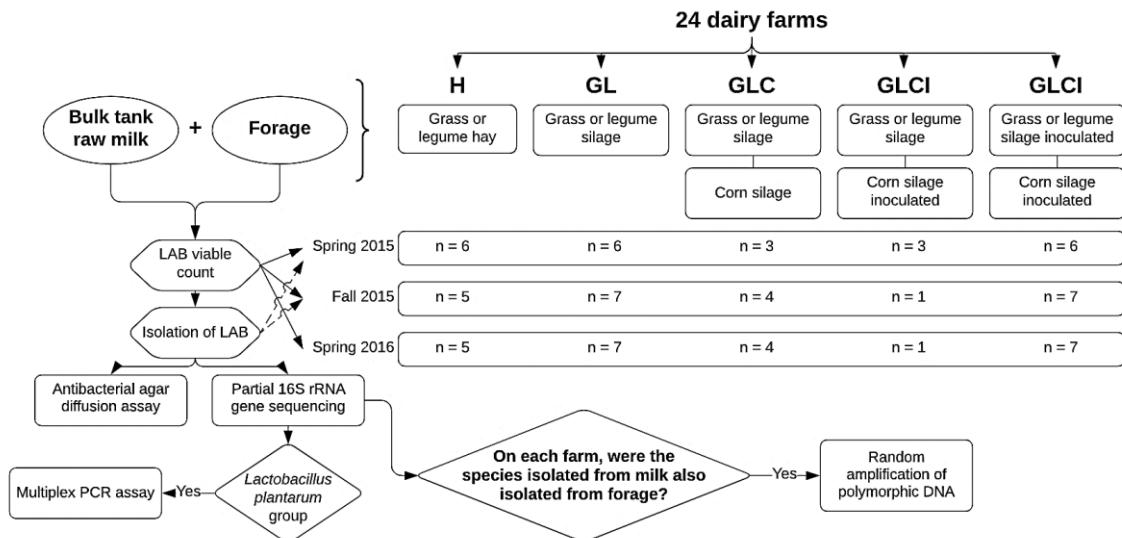
We hypothesized that LAB may transfer from silage to milk, and that this transfer is exacerbated when silages are treated with commercial LAB inoculants. Therefore, this study investigated the effect of silage on the prevalence and abundance of LAB in raw milk. Lactic acid bacteria shown to be able to carry over from dairy cow feeding to milk were then isolated by a culture-dependent approach.

## 2.4 Materials and Methods

### 2.4.1 Farm Sampling

#### 2.4.1.1 Herd Selection

Commercial dairy farms ( $n = 24$ ) in Quebec were recruited using the list provided by the Canadian DHIA (Lactanet, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada), on which farmers consent for the sampling of forages and milk. Farms were divided into five feeding types according to the forages used, representing the common feeding practices in eastern Canada (Figure 2.1). The first group was composed of farms using hay (H; non-fermented) as the sole source of forage, and was defined as the control. The second group was farms feeding grass or legume silage (GL). The third group used grass or legume silage supplemented with corn silage (GLC). The fourth group used grass or legume silage supplemented with corn silage that was inoculated at the time of harvest (CI; combined, GLCI). Finally, the fifth group used grass or legume silage supplemented with corn silage, both inoculated at the time of harvest (GLI; combined, GLICI). The inoculants added by the dairy producers of the GLCI and GLICI groups were those available on the market (Table 2.1), and included Biotal Buchneri 500 and Biotal Supersile (Lallemand Animal Nutrition, Milwaukee, WI), 11CFT, 11C33, and 11G22 (Pioneer, Johnston, IA). None of these herds had access to pasture during sampling periods.



**Figure 2.1.** Flow chart of farm sampling along with quantification, isolation and characterization of lactic acid bacteria.

#### 2.4.1.2 Sampling, isolation, and quantification of lactic acid bacteria

The dairy farms were sampled three times (Figure 2.1). Between the first and second samplings, three farms changed their feeding type. The farm 2H became 7GL, the farm 1GLCI became 7GLICI, and the farm 2GLCI became 4GLC. At each site, forages and raw milk were collected. Fermented forages were ensiled for at least 45 d before collection. All samples were placed in a cooler at 4°C until analysis at the laboratory and were processed within 24 h. Approximately 500 g of each forage were sampled directly from hay barns or silos. The samples were taken with sterilized shovel, or probe (Prov-Vac, St-Jean-Chrysostome, QC, Canada) for the baled material, and were transferred in a bag free from bacteria or other living microorganisms. A first subsample was sent to Lactanet laboratories for near-infrared reflectance spectroscopy analysis of DM and pH. A second subsample of 30 g was placed in a Whirl-Pak bag with a filter (Nasco, Fort Atkinson, WI) and homogenized in Stomacher 400 Circulator (Seward, West Sussex, UK) at 260 rpm for 5 min with 270 mL of peptone-buffered saline containing 1 g/L of Bacto Peptone (BD Biosciences, San Jose, CA) and 9 g/L of NaCl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The mixture was diluted in peptone-buffered saline for viable counts and plated on Man, Rogosa, and Sharpe agar with BromoPhenol Blue (MilliporeSigma, St. Louis, MO; MRS-BPB) for total LAB (Lee and Lee, 2008) and an agar medium containing arginine (MilliporeSigma), bromocresol purple (MilliporeSigma), beef extract (BD Biosciences), and vancomycin (Thermo Fisher Scientific; ABEV agar) for heterofermentative LAB (Sohier et al., 2012). However, viable counts on ABEV agar were revealed to correspond to total LAB because color-based distinction of homofermentative from heterofermentative colonies was difficult. The identification of isolated bacteria has shown that we recovered both types of fermentative LAB. Petri dishes

for both media were incubated at 37°C for 48 h in an anaerobic glove box containing an atmosphere of 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, and 10% CO<sub>2</sub> (Praxair Canada, Mississauga, ON, Canada).

**Table 2.1.** Description of commercial inoculants used on the dairy farms

Feeding type <sup>1</sup>	Farm number <sup>2</sup>	Inoculant <sup>3</sup>	Species in the inoculants <sup>4</sup>				
			<i>L. buchneri</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>
GLCI	1	4	x		x	x	
	2	3	x	x	x		
	3	1	x				x
GLICI	1	1 and 2	x		x		x
	2	1	x				x
	3	1 and 3	x	x	x		x
	4	1	x				x
	5	1	x				x
	6	3 and 5	x	x	x	x	
	7	4 and 5	x		x	x	

<sup>1</sup>GLCI = Grass or legume silage, and corn silage inoculated; GLICI = Grass or legume silage inoculated, and corn silage inoculated.

<sup>2</sup>Farms were numbered sequentially within each feeding group.

<sup>3</sup>1 = Biotal Buchneri 500, and 2 = Biotal Supersile (Lallemand Animal Nutrition, Milwaukee, WI); 3 = 11CFT, 4 = 11C33, and 5 = 11G22 (Pioneer, Johnston, IA).

<sup>4</sup>*L.* = *Lactobacillus*; *E.* = *Enterococcus*; *P.* = *Pediococcus*

For collection of milk samples, the milk in the bulk tank was agitated for 5 min. Then, the tank tap was washed with water. Approximately 10 mL of milk was first discarded, and the milk sample (100 mL) was collected. From this sample, a 10-mL aliquot was homogenized in the stomacher with 90 mL of 2% (wt/vol) sodium citrate (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) at 260 rpm for 5 min. Viable counts in milk were performed as described for forages.

For first and second sampling periods, LAB were isolated from Petri dishes used for viable counts with Harrison's disk to obtain representative isolates of the starting population from forage and milk samples (Ricciardi et al., 2015). The selected colonies were purified by plating on MRS-BPB agar and cultivated in MRS broth. The stock cultures were frozen at -80°C supplemented with 20% (vol/vol) glycerol (EMD Chemicals). The isolates

were labeled RKG (Roy, Kennang, and Gagnon) and were numbered 1 or 2 according to the sampling period followed by the order they were isolated. Samples of the commercial inoculants used on the farms were rehydrated in peptone-buffered saline and plated on MRS-BPB agar. Colonies were selected, purified and frozen as described for forage and milk samples, and were used to extract DNA for random amplification of polymorphic DNA (RAPD).

#### 2.4.2 Bacterial identification and typing

All selected isolates were identified via partial 16S rRNA gene sequencing. First, genomic DNA was extracted using a Geneaid Presto Mini gDNA Bacteria Kit (FroggaBio, Toronto, ON, Canada) with modifications. Mutanolysin (50 U/mL; MilliporeSigma) was added to the gram-positive buffer, and the quantity of lysozyme was increased to 20 mg/mL. Finally, all incubation times in the sample preparation steps were doubled. Yield and quality of DNA were quantified by using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), DNA was diluted to 25 ng/ $\mu$ L. Partial amplification of the 16S rRNA gene (~800 bp) with the universal primers 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') and 788R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAA-3'), as well as the Sanger sequencing were performed according to Gagnon et al. (2020). Forward and reverse strand sequences were aligned with Geneious Pro R6 software (Biomatters, San Francisco, CA). Phylogenetic affiliation of the isolates was determined with the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The 16S rRNA gene sequences are available in GenBank under accession numbers MT044754 - MT045988.

Multiplex PCR assay targeting the housekeeping gene *recA*, as described by Torriani et al. (2001), was carried out for better identification of isolates belonging to the *L. plantarum* group (*L. plantarum*, *L. paraplanatum*, and *L. pentosus*). The PCR amplification was performed using a Tgradient (Biometra, Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada). Conditions and primers for PCR are presented in Supplemental Tables A1 and A2. The PCR products (*L. plantarum*: 318 bp, *Lactobacillus paraplanatum*: 107 bp, and *Lactobacillus pentosus*: 218 bp) were migrated through 2% agarose gel submerged in sodium boric acid buffer for 30 min at 135 mV. Positive controls were *L. plantarum* ATCC 14917 and *L. pentosus* ATCC 8041. Nuclease-free water was used as negative control.

A selection of LAB that could originate from silage was included for typing. For each farm, isolates of the same species collected both in forages and raw milk were selected (Figure 2.1). For example, if on a given farm, *L. plantarum* were isolated in milk, then all isolates from milk, forages, and the corresponding inoculants from this farm were typed. The RAPD with the M13 primer (5'-GAGGGTGGCGGTCT-3'), as described by Ruiz et al. (2014), was used as a typing method. The PCR conditions are presented in Supplemental Tables A3 and A4. The band patterns obtained after migration at 135 mV during 60 min in a 2% agarose gel were normalized and

compared with GelJ V.2.0 software (Heras et al., 2015). Similarity between isolates was determined via Pearson's correlation method (a coefficient working with the densitometric curve associated with the different lanes) and the clustering was performed by unweighted pair group method with arithmetic mean. The genotype was defined at a minimum level of 80% similarity.

#### 2.4.3 Antibacterial agar diffusion assay

Antibacterial activity against spoilage indicator bacteria and cheese starter bacteria was screened for all isolates using the agar well diffusion method described by Fernandez et al. (2013). Briefly, after two subcultures, indicator strains were grown overnight in their optimal broth: tryptic soy broth (BD Biosciences) with 0.6% yeast extract (Thermo Fisher Scientific) for *Listeria ivanovii* HPB28, reinforced clostridial medium (HiMedia Laboratories LLC, West Chester, PA) for *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755, Elliker medium (BD Biosciences) for *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* SK11 and MRS for *Lactobacillus paracasei* ATCC 334. Then, inoculation at 0.6% on the same media with 0.75% agar was performed. Wells were dug in inoculated solidified agar plates, and 80 µL aliquot of isolate supernatant were added. The supernatant of overnight culture in MRS was obtained after centrifugation (10,000 × g, 10 min at 4°C). The plates were incubated 24 h at 37°C (under anaerobic conditions for *C. tyrobutyricum*). After incubation, inhibition zone diameters were measured. Bacteriocin-containing culture supernatants produced clear inhibition zones featuring well-defined margins with a diameter greater than 8 mm (Supplemental Figure A1). The positive controls used were supernatants of *Pediococcus acidilactici* UL5 producing pediocin PA-1, *Lcc. lactis* ATCC 11454 producing nisin A, and *Escherichia coli* MC 4100 producing microcin J25.

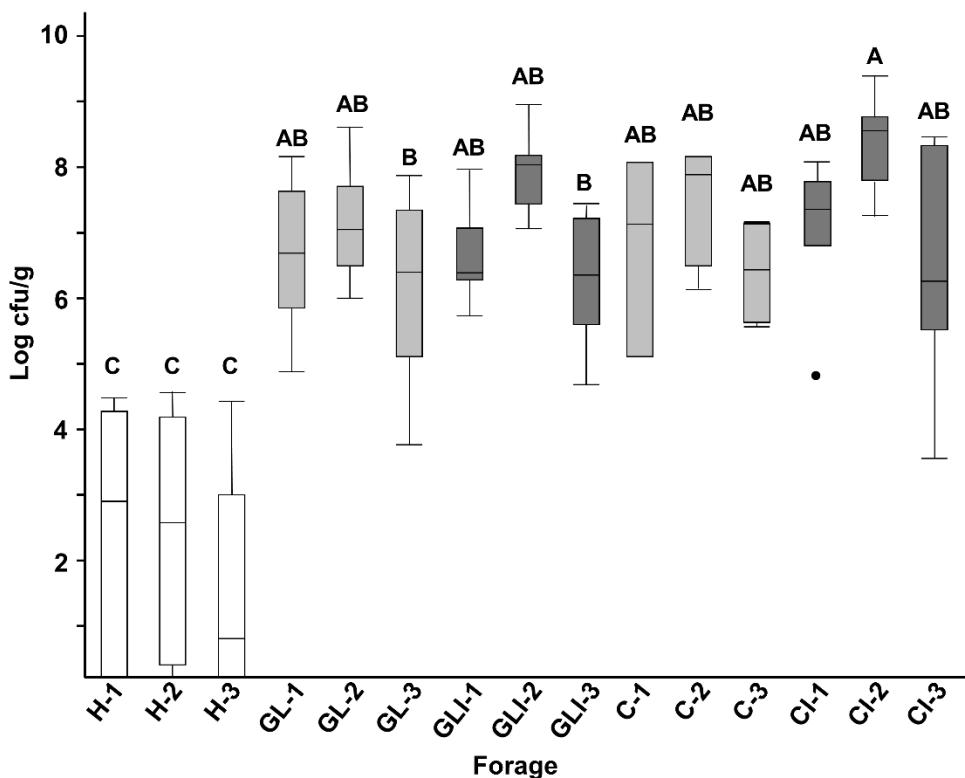
#### 2.4.4 Statistical analysis

Student's t-test, ANOVA, and Tukey's multiple comparisons or Honestly significant difference test on viable counts were used for data with normal distribution and equal variances. Otherwise, counts were analyzed with nonparametric Kruskal-Wallis-Wilcoxon test. Statistical analysis was performed with JMP version 14 software (SAS Institute, Cary, NC). Data of taxonomic group relative abundances were transformed in the R environment (R Core Team, 2013) using Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) and Microbiome (Lahti and Shetty, 2017) packages. Relative abundances were then compared with STAMP version 2.1.3 (Parks et al., 2014). Significance was assessed using an ANOVA comparing multiple groups and Storey's FDR correction was applied to *P*-values.

## 2.5 Results

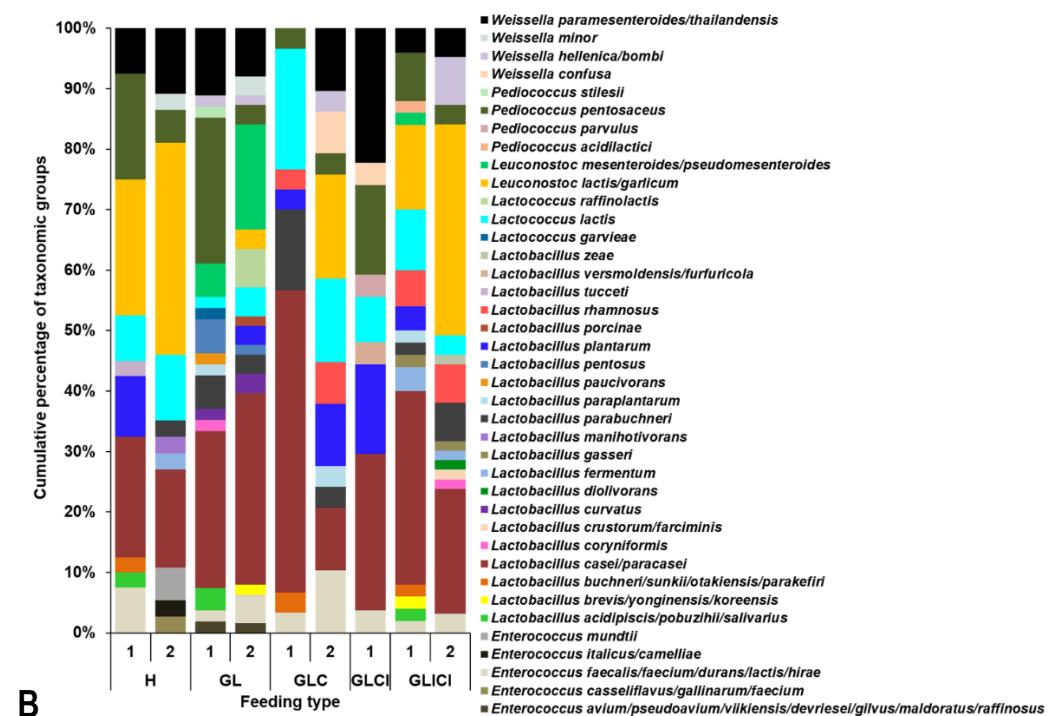
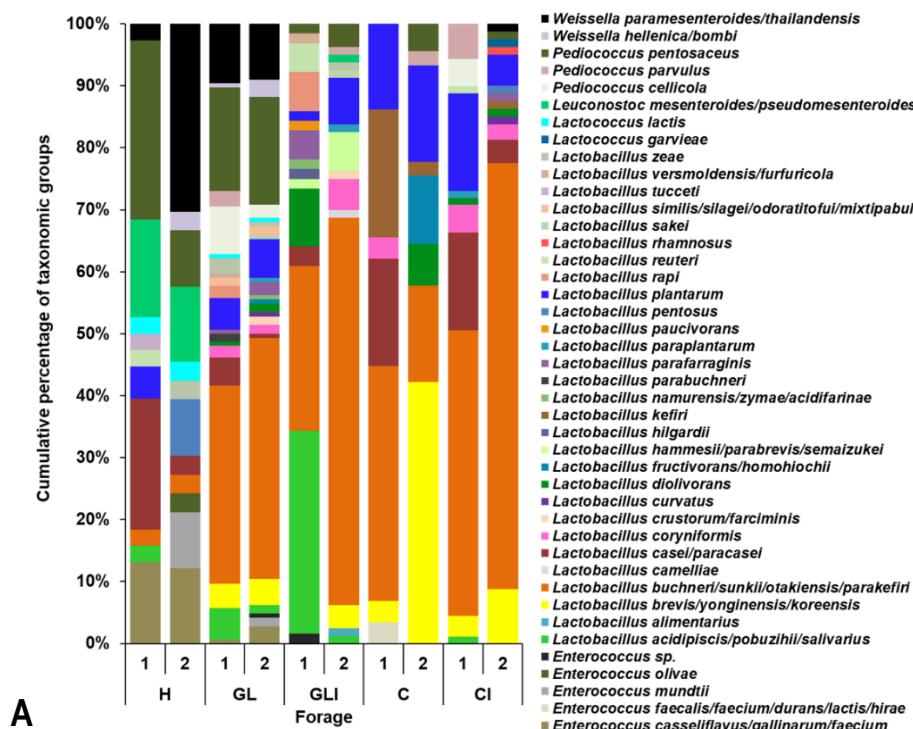
### 2.5.1 Lactic acid bacteria prevalence and abundance in forages

The characteristics of forages were different according to their type (Supplemental Table A5). In particular, the pH of C silage was lower than GL silage, but inoculation did not affect this parameter. The MRS-BPB agar was not specific for LAB (Supplemental Table A6); therefore, only viable counts obtained on the ABEV medium are presented. The LAB viable counts for H were lower ( $2.15 \pm 1.83 \log \text{cfu/g}$ ) than both inoculated and non-inoculated silages (C + CI:  $7.25 \pm 1.30 \log \text{cfu/g}$ ; GL + GLI:  $6.79 \pm 1.05 \log \text{cfu/g}$ ;  $P < 0.01$ ; Figure 2.2). Inoculated silage LAB viable counts were greater than non-inoculated silage only at the second sampling period (C vs. CI:  $P < 0.02$ ; GL vs. GLI:  $P < 0.01$ ).

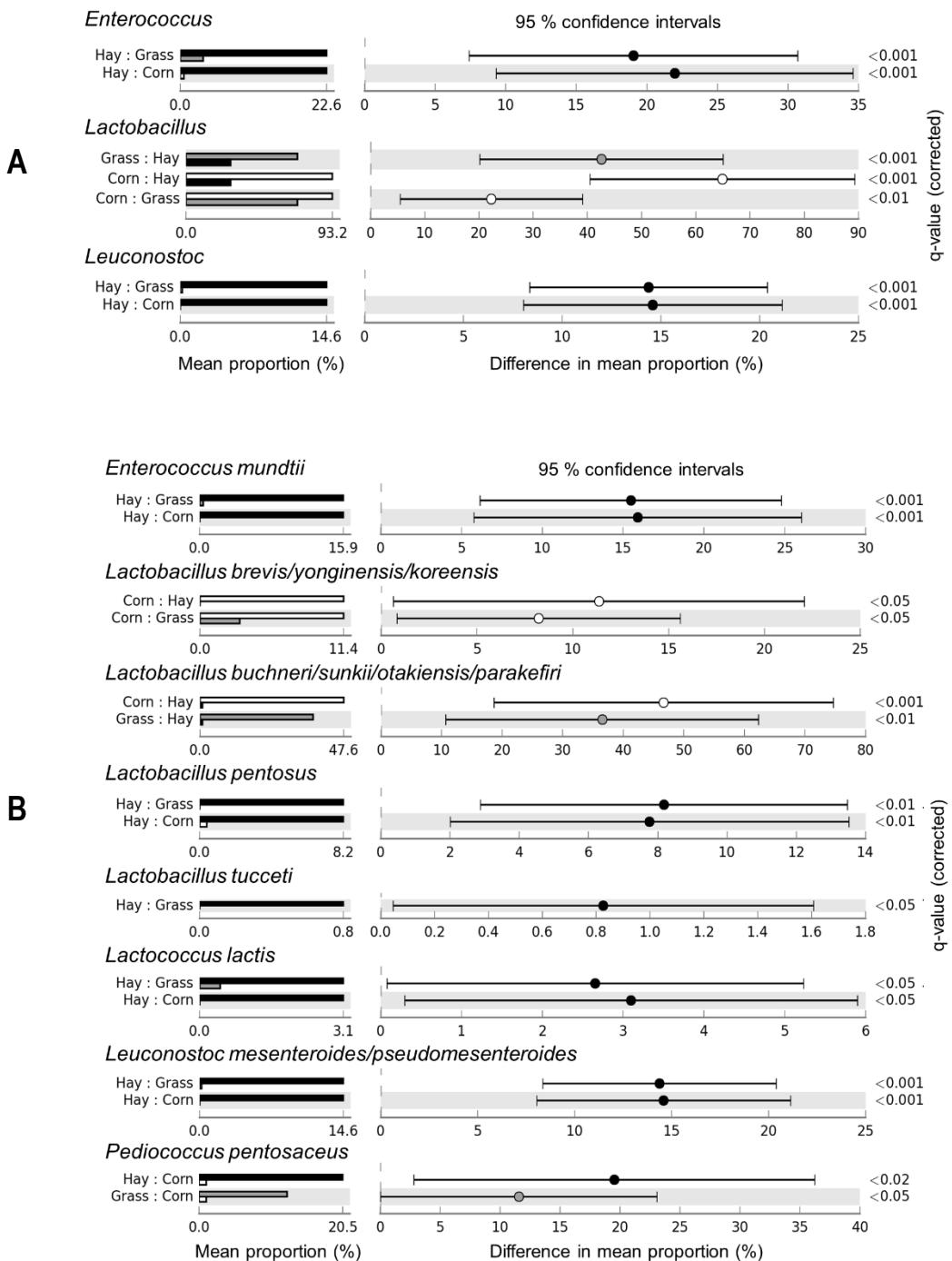


**Figure 2.2.** Box plot of lactic acid bacteria viable counts on ABEV agar in hay (H), grass or legume silage (GL), and corn silage, either non-inoculated (C) or inoculated (CI), for the 3 sampling periods: (1) spring 2015, (2) fall 2015, and (3) spring 2016. Means with different capital letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). Midlines of box plots represent medians, and the ends of boxes represent first and third quartiles. Whiskers represent first quartile  $- 1.5 \times$  (interquartile range) and third quartile  $+ 1.5 \times$  (interquartile range), and dots represent outliers.

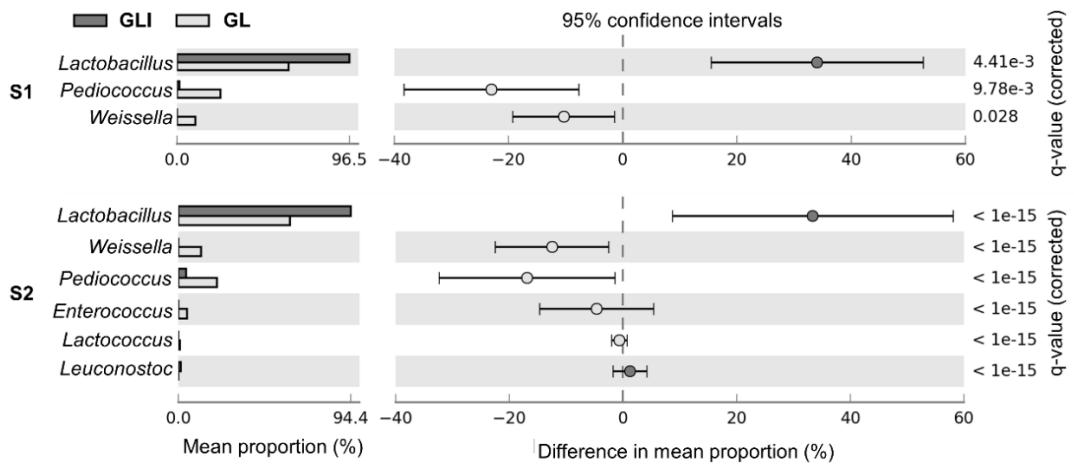
A total of 758 LAB were isolated in forages from the first two sampling periods. They belonged to 42 taxa corresponding to six genera: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Weissella* (Figure 2.3A). Statistical analyses performed with STAMP indicated that LAB profiles differed between H and silages. At the genus level, the difference in mean proportions of *Enterococcus* spp. and *Leuconostoc* spp. were respectively 20 and 15% more abundant in H than silages (Figure 2.4A). The relative abundance of *Lactobacillus* spp. was greater in silages than in H. *Lactobacillus* was the dominant genus in both grass or legume silage (GL + GLI: 72%) and corn silage (C + CI: 93%). At the species level, we also found significant features characterizing the forages (Figure 2.4B). *Enterococcus mundtii*, *L. pentosus*, *Lactobacillus tucctei*, *Lc. lactis*, and *Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides* were specific to H. The *L. buchneri* group was a specific and a dominant taxon in silages, whether inoculated or not (Figures 2.3B and 2.4B). Its relative abundance in grass or legume (GL + GLI) and corn (C + CI) silage samples was 38 and 48%, respectively. *Lactobacillus brevis/yonginensis/koreensis* was also found in silage, but it was more abundant in corn than grass or legume (C + CI: 11% vs. GL + GLI: 5%) silage. *Pediococcus pentosaceus* was more abundant in H (20%) and grass or legume (GL + GLI: 12%) than corn (C + CI: 1.5%). Finally, *Lactobacillus casei/paracasei* and *L. plantarum* were not exclusive to any forage type (Figure 3A). The prevalence and the abundance of LAB did not differ between C and CI silage samples. However, the relative abundance of specific genera was different between GL and GLI silage (Figure 2.5), particularly *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Weissella* for the first two sampling periods. *Lactobacillus* spp. were 35% more abundant in GLI silage. On the other hand, *Pediococcus* spp. and *Weissella* spp. were more abundant in the GL silage. The LAB profile of GL silage samples was intermediate between H profiles and other silages. Indeed, as for hay, GL silage bacteria consisted of *Weissella paramesenteroides/thailandensis* and *P. pentosaceus* in high proportions, and enterococci were present. In addition, GL silage contained a high proportion of the *L. buchneri* group, similar to GLI, C and CI samples.



**Figure 2.3.** Relative abundance of lactic acid bacteria isolated from (A) forages and (B) bulk tank milk for the first (spring 2015), and second (fall 2015) sampling periods. H = hay; GL = grass or legume silage; C = corn silage; I = inoculated silage.



**Figure 2.4.** Comparison of lactic acid bacteria in the different forages: corn silage (white), grass or legume silage (grey) and hay (black). The extended error bar plot presents the lactic acid bacteria significantly different between forages at (A) genus level and (B) species level. Statistical analysis was performed using STAMP software. Multiple test correction was Storey's false discovery rate.



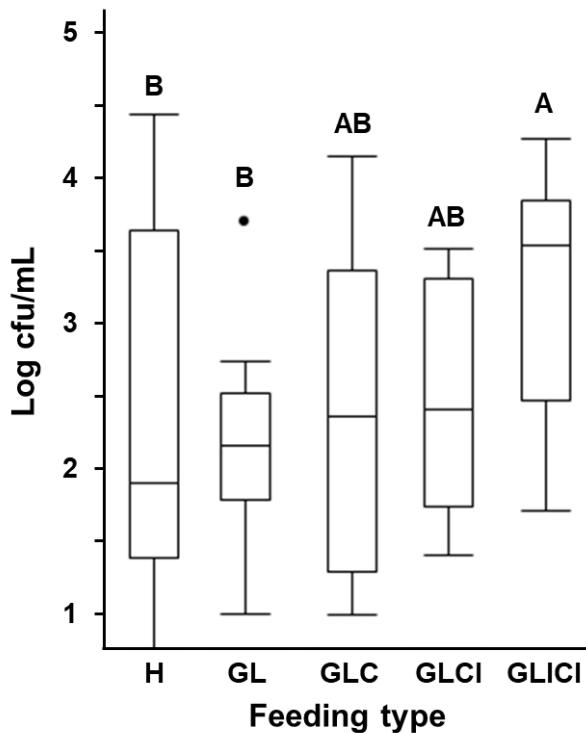
**Figure 2.5.** Effect of inoculation in grass or legume silage (GL). The extended error bar plot presented the lactic acid bacteria significantly different between inoculated (GLI) and non-inoculated silage at the genus level for first (S1; spring 2015) and second (S2; spring 2015) sampling periods. Statistical analysis was performed using STAMP software. Multiple test correction was Storey's false discovery rate.

### 2.5.2 Lactic acid bacteria prevalence and abundance in bulk tank raw milk

We found no effect of sampling periods on LAB viable counts in bulk tank milk samples ( $F = 0.32$ ;  $P < 0.73$ ), the mean concentration being  $2.56 \pm 1.04 \log \text{cfu/mL}$ . Viable counts of LAB differed among milk samples ( $\sim 1 \log \text{cfu/mL}$ ) according to farm feeding types ( $F = 5.16$ ;  $P < 0.005$ ; Figure 2.6). Milk from the GLICL group of farms contained significantly more LAB ( $3.22 \pm 0.82 \log \text{cfu/mL}$ ) than GL ( $2.20 \pm 0.58 \log \text{cfu/mL}$ ) and H ( $2.16 \pm 1.38 \log \text{cfu/mL}$ ) groups.

For the first two samplings, 481 isolates of LAB were recovered from bulk tank raw milk samples. A total of 12 isolates of *Streptococcus* (*S. equinus/lutetiensis*, *S. macedonicus/gallolyticus*, *S. parauberis*, *S. sanguinis*, and *S. uberis*) were not compiled in LAB profiles as they are usually associated with mastitis and they are not found in forage (Cameron et al., 2016). The remaining 469 LAB isolates belong to 39 taxa (Figure 2.3B). Genera identified were the same as those found in forage i.e., *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Weissella*. Even though we found significant differences in LAB profile among forage types, the difference was not so obvious for the milk types. *L. casei/paracasei* was the most abundant group, representing 25% of total. *Leuconostoc lactis/garlicum*, *P. pentosaceus*, *Lcc. lactis*, *W. parmesenteroides/thailandensis*, *Lactobacillus parabuchneri*, and *L. plantarum* were also found in abundance in the different milk samples. Only three isolates belonging to the *L. buchneri* group were identified

in all samples of milk (Figure 2.3B). One farm remained in GLCI category at the second sampling period where only *P. pentosaceus* isolates were identified. Finally, the multiple comparison of relative abundance at genus- and species-levels identified only one significant difference in bulk tank milk samples according to the feeding types. The relative abundance of *Pediococcus parvulus* was greater (3.1%) in GLCI-milk samples than in milk from the other feeding types. However, only one milk sample contained *Pediococcus parvulus* (12%) in this group and in other milk samples.



**Figure 2.6.** Box plot of lactic acid bacteria viable counts in bulk tank milk on ABEV agar according to feeding types. H = hay; GL = grass or legume silage; C = corn silage; I = inoculated feed. Means with distinct capital letters were significantly different ( $P < 0.05$ ). Midlines of box plots represent the median, and the ends of boxes represent first and third quartiles. Whiskers represent first quartile –  $1.5 \times$  (interquartile range) and third quartile +  $1.5 \times$  (interquartile range), and dots represent outliers.

### 2.5.3 Screening for bacteriocin activity

Out of 1,239 isolates collected during this study and from the commercial inoculants, 36 culture supernatants had a strong antibacterial activity against *Lis. ivanovii* HPB28 corresponding to a bacteriocin effect (Table 2.2). Most of these supernatants (64%) came from the *L. plantarum* group isolates. Half of those also inhibited the growth of *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11. A total of 20 *Lactococcus* spp. also had a bacteriocin-like inhibitory effect on *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11. Only *Lcc. lactis* RKG 2-85 inhibited

*C. tyrobutyricum* ATCC 25755 growth. Of all isolates exhibiting bacteriocin activity, 77% were isolated from milk. None of the culture supernatants exhibited a bacteriocin-like activity against *L. paracasei* ATCC 334. None of the isolates from commercial inoculants displayed a bacteriocin-like inhibitory effect.

**Table 2.2.** Culture supernatants that have bacteriocin activity against *Listeria ivanovii* HPB28, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, or *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755

RKG Isolate <sup>1</sup>	Taxonomic group	Feeding type <sup>2</sup>	Farm number <sup>3</sup>	Matrix <sup>2</sup>	Activity against		
					HPB28	SK11	ATCC 25755
2-118	<i>Lactococcus lactis</i>	H	1	Milk		x	
2-124	<i>Lactococcus lactis</i>	H	1	Milk		x	
1-174B	<i>Lactobacillus plantarum</i>	H	2	H	x	x	
1-176	<i>Lactobacillus plantarum</i>	H	2	H	x		
1-175	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	H	2	H	x		
1-174A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	H	2	H	x		
2-85	<i>Lactococcus lactis</i>	H	4	Milk	x	x	x
1-205	<i>Lactococcus lactis</i>	H	5	H		x	
1-135	<i>Lactococcus lactis</i>	H	6	Milk		x	
1-136	<i>Lactococcus lactis</i>	H	6	Milk		x	
1-138	<i>Lactococcus lactis</i>	H	6	Milk		x	
2-705	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	GL	7	H <sup>4</sup>		x	
2-707	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	GL	7	H <sup>4</sup>		x	
2-760	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GL	7	Milk	x	x	
2-759	<i>Lactococcus lactis</i>	GL	7	Milk		x	
1-77	<i>Lactobacillus paraplatnarum</i>	GL	1	Milk	x		
2-361	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GL	1	Milk	x		
2-172	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GL	2	Milk		x	
2-181	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	GL	2	Milk		x	
2-182	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	GL	2	Milk		x	
1-243	<i>Pediococcus stilesii</i>	GL	3	Milk	x	x	
2-582	<i>Lactobacillus pentosus</i>	GL	3	Milk	x		
2-571	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GL	3	Milk	x		
2-567	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	GL	3	Milk		x	
2-572	<i>Lactococcus lactis</i>	GL	3	Milk		x	
2-574	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	GL	3	Milk		x	
2-770	<i>Lactococcus lactis</i>	GL	4	Milk		x	
2-771	<i>Lactococcus lactis</i>	GL	4	Milk		x	
2-413	<i>Enterococcus mundtii</i>	GL	5	GL	x		
1-103	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GL	5	Milk	x		
1-541	<i>Pediococcus acidilactici</i>	GL	6	Milk	x		
2-433	<i>Lactococcus lactis</i>	GLC	2	Milk		x	
2-436	<i>Lactococcus lactis</i>	GLC	2	Milk		x	

2-212	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLC	4	Milk	x	x
2-213	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	GLC	4	Milk	x	
2-229	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLC	4	C	x	x
2-227	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLC	4	C	x	x
1-613	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLC	3	Milk	x	x
1-615	<i>Lactococcus lactis</i>	GLC	3	Milk		x
1-616	<i>Lactococcus lactis</i>	GLC	3	Milk		x
1-618	<i>Lactococcus lactis</i>	GLC	3	Milk		x
1-619	<i>Lactococcus lactis</i>	GLC	3	Milk		x
1-634	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLC	3	C	x	x
1-593	<i>Lactococcus lactis</i>	GLCI	1	Milk		x
1-592	<i>Lactococcus lactis</i>	GLCI	1	Milk		x
1-506	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLCI	2	Milk	x	x
1-500	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLCI	2	Milk	x	
1-478	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLCI	3	Milk	x	
2-664	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLICI	1	GLI	x	x
1-378	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GLICI	1	Milk	x	x
1-380	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	GLICI	1	Milk	x	x
1-371	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLICI	1	Milk	x	
1-375	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLICI	1	Milk	x	
2-726	<i>Enterococcus faecium</i>	GLICI	1	Milk	x	
2-336	<i>Lactobacillus zeae</i>	GLICI	2	Milk	x	
2-468	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	GLICI	3	Milk		x
2-471	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	GLICI	3	Milk		x
1-381	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	GLICI	4	CI	x	x
1-254	<i>Pediococcus acidilactici</i>	GLICI	4	Milk	x	
2-33	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLICI	5	GLI	x	
1-193	<i>Lactococcus lactis</i>	GLICI	6	Milk		x
1-196	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	GLICI	6	Milk		x
2-297	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	GLICI	6	Milk	x	
1-178	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GLICI	6	CI	x	x

<sup>1</sup> The isolates were labeled RKG (Roy, Kennang, and Gagnon) and were numbered 1 or 2 according to the sampling period followed by the order they were isolated.

<sup>2</sup>H = Hay; GL = Grass or legume silage; C = Corn silage; GLI = Grass or legume silage, inoculated; CI = Corn silage, inoculated.

<sup>3</sup>Farms were numbered sequentially within each feeding group.

<sup>4</sup>Hay sample from farm 7GL.

## 2.5.4 Typing of bacteria potentially transferred from forage to milk

For each farm, isolates belonging to the same species, and shared in both milk and forages, were typed. Out of 481 milk isolates, 172 were part of at least one forage or commercial inoculant and belonged to 18 taxa (Table 2.3). The 172 RAPD patterns were compared by species for each farm using Pearson's correlation analysis. Thus, 65 dendograms were produced (Supplemental Figure A2). We identified 36 isolates (7%) more likely to be transferred from silage to milk as they shared more than 80% similarity (Table 2.4). Among these 36 isolates, few belonged to the same lineage; corresponding to 31 strains, which can be divided in nine taxonomic groups: *E. mundtii* (1), *L. brevis* group (1), *L. buchneri* group (1), *L. casei/paracasei* (5), *L. paraplatnarum* (1), *L. plantarum* (5), *L. tucctei* (1), *P. pentosaceus* (9), and *W. paramesenteroides* group (7). They were associated with the five type of forages (H: 8 strains; GL: 8 strains; GLI: 4 strains; C: 4 strains; Cl: 5 strains). Moreover, five strains were highly similar to commercial inoculants. Screening for bacteriocin activity supports the possibility of a transfer from silage to raw milk of the strains RKG 2-212 and 2-227, as they both produced an antibacterial effect on *Lis. ivanovii* HPB28 and had 94% similarity. Bacteriocin screening also confirmed that four of these indicated that 27 strains were shared between silage and bulk tank raw milk.

**Table 2.3.** Number of milk isolates belonging to species also collected in forages or commercial silage inoculants on a given farm

Feeding type <sup>1</sup>	Farm number <sup>2</sup>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> group	<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>Lactobacillus acidipiscis</i> group	<i>Lactobacillus brevis</i> group	<i>Lactobacillus buchneri</i> group	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	<i>Lactobacillus corniformis</i>	<i>Lactobacillus paraplatnarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus tuccei</i>	<i>Lactobacillus versmoldensis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Weissella hellenica/bombi</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
H	1															1			
	2							2		1						3		2	
	3	1	2					1								1			
	4							7											
	5							3			1	1				1	1	6	
	6															4	1		
GL	1				1	1		1	1	1						1	4		
	2															5	2		
	3								1							1	2		
	4												2			1	2		
	5															5	1		
	6						13												
GLC	1					1													
	2		4									1							
	3						5					1							
	4											2							
GLCI	1	1					5					1							
	2						2					2				1	4		
	3										1	1	1			10			
GLICI	1							1	1	1	1	2				2	2		
	2				1	1	3												
	3					1											2		
	4																2		
	5						9												
	6					1	14												
Total		1	5	3	1	3	2	65	2	1	13	1	1	3	5	1	39	1	25

<sup>1</sup>H = Hay; GL = Grass or legume silage; C = Corn silage; GLI = Grass or legume silage, inoculated; CI = Corn silage, inoculated.

<sup>2</sup>Farms were numbered sequentially within each feeding group.

**Table 2.4.** Relationship of milk isolates with forage isolates or commercial silage inoculants

Farm number <sup>1</sup>	Feeding type <sup>2</sup>	Taxa	Milk isolate <sup>3,4</sup>	Forage/Inoculant isolate <sup>5</sup>	Sample type <sup>2</sup>	Similarity (%) <sup>6</sup>
1	H	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2-121	1-161	H	83
				1-162	H	84
2	H	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	2-748*	1-658A	H	90
			2-749*	1-658A	H	90
		<i>Weissella paramesentoides</i> group	1-173*	2-704	H	91
			2-757*	2-704	H	91
3	H	<i>Enterococcus mundtii</i>	2-102	2-95B	H	92
5	H	<i>Lactobacillus tucctei</i>	1-198	1-206	H	94
		<i>Weissella paramesentoides</i> group	2-630	2-625	H	90
			2-635	1-208	H	96
6	H	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1-141*	2-811	H	91
			1-142*	2-811	H	84
			2-802*	2-811	H	89
1	GL	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1-74	2-379	GL	84
				2-380	GL	85
				2-383	GL	85
3	GL	<i>Weissella paramesentoides</i> group	1-240	2-552	GL	95
				2-555	GL	90
				2-547	GL	81
			2-581	2-552	GL	99
				2-555	GL	96
4	GL	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2-777	1-406	GL	82
				1-414	GL	87
				1-418	GL	96
5	GL	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2-399	1-83	GL	80
2	GLC	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2-439	2-449	C	80
3	GLC	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	1-623	1-640	C	89
			2-69	1-629	GL	86
				1-631	GL	85
4	GLC	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2-211	<b>2-219</b>	C	86
				2-222	C	90
				<b>2-227</b>	C	93
			2-212	<b>2-219</b>	C	85
				2-222	C	91
				<b>2-227</b>	C	94

1	GLICI	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	2-719	2-675	CI	95
		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<b>1-380</b>	2-668	GLI	82
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	<b>1-375</b>	2-671	GLI	84
				1-351	CI	82
				Ino2C	INO	88
				Ino2G	INO	84
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1-374	Ino1E	INO	81
			<b>1-378</b>	Ino1E	INO	81
		<i>Weissella paramesentoides</i> group	2-708	2-674	CI	97
2	GLICI	<i>Lactobacillus buchneri</i> group	1-227	2-325	GLI	85
				2-329	GLI	92
				1-300	CI	81
				1-301	CI	83
				1-302	CI	85
3	GLICI	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2-474	Ino1C	INO	81
				Ino1E	INO	88
5	GLICI	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	1-88*	1-89	GLI	88
			2-1*	1-89	GLI	80
6	GLICI	<i>Lactobacillus brevis</i> group	1-189B	1-180A	CI	92
2	GLCI	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<b>1-500</b>	Ino3A	INO	85
				Ino3E	INO	89
				Ino3L	INO	88
		<i>Weissella paramesentoides</i> group	1-502	1-510B	GL	81
3	GLCI	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1-534	2-263	GL	89

<sup>1</sup>Farms were numbered sequentially within each feeding group.

<sup>2</sup>H = Hay; GL = Grass or legume silage; C = Corn silage; GLI = Grass or legume silage, inoculated; CI = Corn silage, inoculated; INO = Commercial inoculant.

<sup>3</sup>Isolates identified with a star (\*) belong to the same strain on the same row.

<sup>4</sup>Codes of isolates producing antibacterial activity against *Listeria ivanovii* HPB28 are in bold.

<sup>5</sup>Ino1 = Biotal Buchneri 500, and Ino2 = Biotal Supersile (Lallemand Animal Nutrition, Milwaukee, WI); Ino3 = 11CFT (Pioneer, Johnston, IA).

<sup>6</sup>Milk isolates possessing more than 80% similarity to forage isolates or commercial silage inoculants as determined by the Pearson's Correlation Analysis applied to Random Amplified Polymorphic DNA results.

## 2.6 Discussion

In the present study, LAB presence in eastern Canadian farm-scale silage samples was in agreement with a meta-analysis by Oliveira et al. (2017). The mean LAB count for non-inoculated silage were 7.04 log cfu/g, regardless of the forage type. Our results are also similar to data reported previously from Italian farms (Rossi and Dellaglio, 2007). In that study, LAB viable counts for non-inoculated farm-made mature corn and alfalfa silages were respectively 7.71 and 6.71 log cfu/g. Our LAB viable counts in C silage are also similar to results from Blajman et al. (2018) meta-analysis. According to their investigation, the mean LAB counts were 7.27 and 6.40 log cfu/g for inoculated and non-inoculated silage, respectively. In our work, unlike Reich and Kung (2010) and Guo et al. (2018), LAB viable counts were not much greater in inoculated than in non-inoculated silage samples. However, their studies were performed in laboratory-made, rather than farm-made silage.

The LAB communities differed according to forage types (Figures 2.3, 2.4 and 2.5). Indeed, enterococci were associated with H and GL silage. They are known to be epiphytic in fresh alfalfa crops but are diminished during ensiling when *Lactobacillus* are growing (Guo et al., 2018; Yang et al., 2019). *Enterococcus mundtii* was found specifically in association with H. This species was found to be epiphytic on fresh grass and legume crops (Muller et al., 2001; Guo et al., 2018). The greater relative abundance of *Enterococcus* spp. in H can be linked to their capacity to survive a long period under dry conditions (Wendt et al., 1998). Likewise, *Lcc. lactis* abundance in H was probably due to their ability to survive high osmolarity and dehydration (Sanders et al., 1999). In the present study, *Leu. mesenteroides/pseudomesenteroides* was also retrieved from H. Lin et al. (1992) found *Leu. mesenteroides* on fresh alfalfa and corn plants but not after ensiling. This species can initiate the fermentation of forage, but it is not as acidotolerant as *Lactobacillus* spp. (Holzer et al., 2003). Past studies also showed the dominance of lactobacilli in corn and grass silage materials, between 50 and 98% (Hu et al., 2018; McAllister et al., 2018; Yang et al., 2019). *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, and *L. buchneri* are known to tolerate high acidity (Dunière et al., 2013). The *L. buchneri* group was the dominant species in silage, inoculated or not. Similar to the present study, Stevenson et al. (2006) showed that its relative abundance in inoculated alfalfa silage was comparable to the non-inoculated silage. *Lactobacillus buchneri* became the dominant LAB in mature silage samples (Zhou et al., 2016; Muck et al., 2018a). Genomic, transcriptomic and proteomic analysis of this species have demonstrated its resistance against competing microorganisms by different mechanisms such as the production of lactic acid, acetic acid, and hydrogen peroxide (Heinl and Grabherr, 2017). Unlike the majority of LAB, this species can use lactic acid as an energy source (Muck et al., 2018a), explaining its dominance in silage when the water-soluble carbohydrates are low. The *L. brevis* taxon was commonly found in grass and corn silage (Dunière et al., 2013). In our study, this obligate heterofermentative group was more abundant in C silage than in GL silage. The pH of C silage was lower than that of GL silage, and, as previously mentioned, *L. brevis* is an acidotolerant species. Furthermore, *L. brevis* was

more abundant in the fall sampling. It could be linked to the warmer temperature, as Zhou et al. (2016) found a greater abundance of *L. brevis* when corn was ensiled between 15 and 25°C in comparison to 5 and 10°C.

The LAB profile did not differ between C and CI silage samples. This could be explained by the lower buffering capacity of corn compared with alfalfa (Queiroz et al., 2018). Therefore, pH will decrease easily in both C and CI silage samples, quickly promoting acidotolerant lactobacilli. In their meta-analysis on inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative LAB from silage materials, Oliveira et al. (2017) also demonstrated that the inoculation effect depends on the forage plants. Inoculation at harvest improved fermentation of grass and legumes silage, but not of corn silage. In our study, GL silage and H showed similarities, such as a high relative abundance of *P. pentosaceus* and *W. paramesenteroides/thailandensis*. *Pediococcus pentosaceus* is not exclusively epiphytic on grass and legume crops. Indeed, its proportion on alfalfa and corn have been shown to be similar (Lin et al., 1992a; Cai et al., 1999). When GL silages were inoculated, the relative abundance of *P. pentosaceus* decreased. Stevenson et al. (2006) and Yang et al. (2019) demonstrated similar results with a greater abundance of *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp., and *Weissella* spp. in non-inoculated alfalfa silage.

Even though LAB profiles and concentrations vary according to forage types, these differences were not reflected in raw milk. The concentration of LAB in raw milk is in agreement with data found in literature, which is to say between  $10^1$  cfu/mL and  $10^4$  cfu/mL (Quigley et al., 2013). *Lactobacillus casei/paracasei* was the dominant LAB in raw milk, as found by Vacheyrou et al. (2011) on French farms. This species and the other dominant LAB (*L. casei/paracasei*, *P. pentosaceus*, *W. paramesenteroides/thailandensis*, *Lcc. lactis/garlicum*, *L. parabuchneri*, and *L. plantarum*) are often among the NSLAB in cheese (Quigley et al., 2011; Fox et al., 2017e). We expected to find more *L. buchneri* in milk samples from silage-fed herds as it was dominant in fermented forage and has already been found in cheese (Desfossés-Foucault et al., 2013; Blaya et al., 2018). However, this taxon was rarely isolated in raw milk. Its resistance mechanisms such as the use of lactic acid as an energy source and acid tolerance are not operational selective measures in raw milk, unlike silage.

Silage has previously been identified as a critical source of contamination with bacterial spores in milk (te Giffel et al., 2002; Driehuis et al., 2016). However, our RAPD typing results suggested that only a few LAB strains probably originating from silage were recovered in raw milk. Therefore, the use of silage did not seem to be the major contamination source of LAB in raw milk. Our study did not allow us to identify how this contamination occurred. It could have been through transmission in the barn, by direct contact of forages with cow's hair and skin, including udder and teats, or through fecal contamination. For example, spores from silage were previously found in cow feces suggesting their resistance to digestion (Driehuis et al., 2016). Spores are probably more resistant than bacteria to the conditions encountered on farms, particularly during ensiling,

feeding and milking. Teat canals of dairy cows can contain LAB (Bouchard et al., 2015) although LAB are not among the principal bacteria of the bovine mammary microbiota (Falentin et al., 2016).

Metagenomic analysis suggested that lactobacilli are niche specialists (Stefanovic et al., 2017a) Their adaptation to specific niches such as milk result in the acquisition of new genes via horizontal transfer and loss of coding sequences that are not needed. Their survival capacities in environmental niches such as plants are reduced. This could explain why few forage isolates were collected in milk. Also, LAB specific to forage niche could lack genes important for intestinal tract survival. Therefore, their transfer opportunities from feces to milk may be reduced. The strains that seem adapted to silage and milk belonged to *L. casei/paracasei*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* and *W. paramesenteroides* group. Stefanovic and McAuliffe (2018) demonstrated heterogeneity in the genome of three *L. paracasei* strains isolated in the same niche (Cheddar cheese). They were able to link the genome of one strain to a prior plant-based niche. In the case of *L. plantarum*, strains from different niches (insect gastrointestinal tracts, human feces, olives, fruits, sourdoughs, and cheese) modulated their transcriptome to adapt to MRS medium (Filannino et al., 2018). Little information is available on the genomics of *P. pentosaceus* and *W. paramesenteroides/thailandensis* as well as their adaptation to ecological niches such as silage and milk.

In the present study, LAB prevalence and abundance in raw milk samples from farms using silage inoculated with *L. buchneri* was not different from other feeding types. Moreover, RAPD typing and the bacteriocin screening eliminated all but two milk strains that can be linked to commercial inoculants. Therefore, the management practice of silage inoculation should not negatively affect cheese making. In addition, inoculation could be endorsed for limitation of enterococci in GL silage types. *Enterococcus* spp. are known to be thermostable (Gagnon et al., 2020a) and can cause defects during cheese making (Giraffa, 2003). However, more attention should be paid to the *L. casei/paracasei* and *L. plantarum* inoculants. These facultative heterofermentative species seem more adapted to diverse ecological niches and are commonly found as NSLAB in cheese (Blaya et al., 2018; Stefanovic and McAuliffe, 2018). Moreover, some strains of *L. plantarum* isolated from silage were also able to inhibit the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11. The presence of these NSLAB could reduce starter activity and thus affect milk acidification during cheese manufacture.

## 2.7 Conclusions

Even though LAB prevalence and abundance differed according to forage type, this was not the case for bulk tank milk samples. The findings presented in this study confirm that silage is a minor source of contamination of LAB for raw milk. Out of 481 milk isolates, 27 strains could be associated with silage. The majority of these belonged to four taxonomic groups: *L. casei/paracasei*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, and *W. paramesenteroides*. These strains should be investigated further for their heat resistance and their potential

effects on cheese making. Finally, only two strains could originate from commercial inoculants and they were not identified as *L. buchneri*. Thus, inoculation of silage with *L. buchneri* did not seem to increase milk contamination with obligate heterofermentative LAB.

## 2.8 Acknowledgments

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Ottawa), Novalait (Quebec, Canada), Agriculture and Agri-Food Canada (Ottawa), and the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies for their financial contribution. They also give special thanks to the Op+Lait research group (Saint-Hyacinthe, Canada) for a scholarship award to M. Gagnon. The authors would like to thank Benoît Fernandez, a member of Dr. Ismail Fliss's team (Université Laval, Quebec, Canada) for his technical assistance and scientific advice on bacteriocin screening. The authors express thanks to all members of Dr. Roy's team (Université Laval, Quebec, Canada), particularly Marie Verheyde, Myriam Laberge, Claire Vogel, Marianne Camara, and Halimatou Diallo. The authors are very grateful to Robert Berthiaume from Lactanet (Sainte-Anne-de-Bellevue, Canada), who helped in the selection of farms, and all dairy farmers who agreed to participate in the project. Finally, the authors sincerely thank Dominique Fournier ([www.serviceslinguistiquesdf.com](http://www.serviceslinguistiquesdf.com)) for editing and improving the text of the manuscript.

# **Chapitre 3 – Impact de deux bactéries lactiques thermorésistantes de la flore secondaire sur la fabrication modèle de cheddar**

## **Impact of two thermostable non-starter lactic acid bacteria strains on model Cheddar production**

Méribie Gagnon<sup>1,2</sup>, Charles Goulet<sup>3\*</sup>, Gisèle LaPointe<sup>2,4</sup>, P. Yvan Chouinard<sup>2,5</sup>, Denis Roy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de génomique microbienne, Département de Sciences des aliments, Université Laval, Québec, QC, Canada

<sup>2</sup>Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait), Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup>Département de phytologie, Université Laval, Québec, QC, Canada

<sup>4</sup>Food Science Department, University of Guelph, Guelph, ON, Canada

<sup>5</sup>Département des sciences animales, Université Laval, Québec, QC, Canada

### **3.1 Résumé**

Les pratiques de gestion employées dans les fermes laitières peuvent modifier le microbiote du lait et par le fait même peuvent moduler les bactéries lactiques de la flore secondaire du fromage (NSLAB). Ces dernières peuvent causer des défauts organoleptiques. Cette étude a pour but d'évaluer l'impact de deux NSLAB dans la fabrication du fromage cheddar, soit une souche associée à l'ensilage de maïs : *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212, et une souche isolée après la pasteurisation du lait provenant d'une ferme utilisant l'ensilage de graminées et de légumineuses et l'ensilage de maïs: *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10. Premièrement, la thermorésistance de ces souches après un traitement à 60 °C pendant 5 min a été évaluée et comparée à des souches de références. Elles ont démontré une thermorésistance élevée en comparaison à trois autres souches de bactéries lactiques, soit *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ATCC 19257 et SK11 et *L. plantarum* ATCC 14917 ( $P < 0.0001$ ). Ces deux NSLAB ont perdu moins d'un log d'UFC/mL et leur génome contenait une occurrence élevée de gène codant pour des protéines de résistances au choc thermique. Pendant le test de Pearce simulant la production de cheddar, ces souches n'ont pas démontré

d'interaction avec le ferment lactique *Lcc. lactis* spp. *cremoris* SK11 et leur population est demeurée stable. Pendant la modélisation de l'affinage, *L. delbrueckii* RKG R10 a perdu légèrement en viabilité dans les caillés modèles incubés à 30 °C pour 12 jours. Quant à *L. plantarum* RKG 2-212, elle a eu une croissance considérable, passant de 6.51 à 8,27 log d'UFC/g. Cette croissance a été associée à l'acidification des caillés modèles ( $P < 0.0001$ ). La présence des NSLAB a modifié le profil des composés volatils évalué par chromatographie en phase gazeuse expliquant 10,7% de la variation entre les échantillons. La souche *L. plantarum* RKG 2-212 a produit une plus grande concentration de composés volatils comme l'acide acétique et le 2-methylbutyraldehyde pouvant être associé à des défauts organoleptiques. Donc, l'ensilage peut être un vecteur de bactéries lactiques thermorésistantes pouvant mener à des défauts de flaveurs dans le fromage.

### 3.2 Abstract

Dairy farm management practices can modify milk microbiota and therefore modulate non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) found in cheese. These NSLAB can cause organoleptic defects. This study aimed to investigate the impact of two NSLAB in Cheddar cheese manufacture: *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 a corn silage associated strain and *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10, a strain isolated after pasteurization of milk from a farm using grass and legume silage, and corn silage. The thermostability of these two NSLAB was first evaluated after treatment at 60 °C for 5 min and compared to reference strains. Both NSLAB were highly thermostable compared to other three lactic acid bacteria which are *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257 and SK11, and *L. plantarum* ATCC 14917 ( $P < 0.0001$ ). They lost less than 1 log cfu/mL and their genome contained a great number of copy number of genes coding for heat shock protein. During a Pearce test activity simulating Cheddar production, the two NSLAB did not show interaction with the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11, and their population remained stable. During a ripening simulation, *L. delbrueckii* RKG R10 had a slight loss in viability in cheese slurry samples incubated at 30 °C for 12 d. However, *L. plantarum* RKG 2-212 had considerable growth, from 6.51 to 8.27 log cfu/g. This growth was associated with the acidification of the slurries ( $P < 0.0001$ ). The presence of the NSLAB modified the profile of volatile compounds evaluated by gas chromatography, accounting for 10.7% of the variation. The strain *L. plantarum* RKG 2-212 produced volatile compounds in greater quantity that could be associated with organoleptic defects such as acetic acid and 2-methylbutyraldehyde. Therefore, silage can be a vector of thermostable lactic acid bacteria for milk which can lead to flavor defects in cheese.

### 3.3 Introduction

For cheesemakers, it is crucial to focus on the quality and consistency of their cheese regarding consumer preferences. This is especially important for large volume commercial cheese such as Cheddar (Kilcawley, 2017). One of the most important features for consumer acceptance is the flavor (Murtaza et al., 2014). The cheese flavor consists of non-volatile compounds such as bitter peptides (Karametsi et al., 2014) and more importantly a balanced mix of volatile compounds (Kilcawley, 2017). In Cheddar, more than 200 volatile metabolites were identified. They are acids, alcohols, aldehydes, ketones, and phenolic and sulfur compounds (O'Riordan and Delahunty, 2003; Singh et al., 2003; Murtaza et al., 2014). The characterization of volatile compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is helping to associate them with flavor defects or consumer preferences (Iwasawa et al., 2014; Mentana et al., 2016; Sádecká et al., 2016). These molecules came from catabolic pathways involving the breakdown of milk constituents: metabolism of residual lactose, lactate and citrate, lipolysis and fatty acid metabolism, and proteolysis and amino acid catabolism. These reactions are modulated by cheese microbiota during ripening (Fox et al., 2017b; Pangallo et al., 2019; Afshari et al., 2020). Cheddar microbiota is mostly composed of lactic acid bacteria (LAB). During Cheddar manufacture, mesophilic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* or *lactis* are added as starter. Along with the starter, adjunct culture belonging mostly to *Lactobacillaceae* can also be added for flavor improvement (Gobbetti et al., 2015; Nateghi, 2017; Stefanovic et al., 2018). There are also non-starter acid lactic bacteria (NSLAB) which are present in cheese without being purposely added (Desfossés-Foucault et al., 2013; Fox et al., 2017e). Their concentration can be low in milk, but can increase during cheese making (Blaya et al., 2018). They are mainly facultatively heterofermentative lactobacilli, introducing a hardly controllable variability that can produce flavor defects (Banks and Williams, 2004; Fox et al., 2017e).

The NSLAB may be associated with the factory microbial environment such as biofilms on dairy equipment (Licitra et al., 2007; Chamberland et al., 2017). However, they can also come from raw milk (Levante et al., 2017; Blaya et al., 2018). Thus, they need to be heat-tolerant as Cheddar is made from pasteurized or thermized milk (Desfossés-Foucault et al., 2013). They also need to resist to Cheddar manufacture stresses (acid, salt, and cooking) to have an impact on cheese flavor (Taïbi et al., 2011). Moreover, during ripening, there is a competition between LAB for energy sources (Levante et al., 2017). Pearce activity test and cheese slurries are good experimental Cheddar models to follow the behavior of bacteria facing these stresses (Desfossés-Foucault et al., 2014). Bacteria can be under viable but not cultivable (VBNC) state, especially when they are under stress (Gagnon et al., 2015; Fernandez et al., 2016). Therefore, to have a better insight into the behavior of LAB during cheesemaking, assessment of viability can be performed by PMA-qPCR which allows quantification of cultivable and VBNC bacteria but discards dead cells (Desfossés-Foucault et al., 2012).

Dairy farm environmental factors such as geographical regions, animal conditions (teat, feces, and stage of lactation), and management practices (milking machine, litter, and access to pasture) have an impact on the composition of raw milk microbiota (Gobbetti et al., 2018; Skeie et al., 2019; Gagnon et al., 2020a). It was demonstrated that silage, a LAB fermented forage used in dairy cow feeding, can be a source of contaminating facultative heterofermentative LAB for milk (Gagnon et al., 2020b). In that previous study, LAB from raw milk and different types of forages were characterized by random amplified polymorphic DNA and antibacterial agar assay. On a particular farm of this study, the strain *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 has been identified both in raw milk and in the isolates from the non inoculated corn silage used to feed the cows. This strain also had an antibacterial effect against Cheddar cheese starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11. In the course of another survey on 6 farms using silage conducted in the Fall 2016, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 was the only thermoresistant lactobacilli that has been identified in bulk tank milk. This strain was isolated from a herd fed non inoculated grass and legume silage supplemented with non inoculated corn silage.

The impact of NSLAB originating from silage in Cheddar production is not well known. We hypothesize that heterofermentative NSLAB from silage are thermoresistant and are producing defects during Cheddar production. The objective of this study is to determine the thermoresistance of *L. plantarum* RKG 2-212 that has an antibacterial effect against *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 and to evaluate its activity (viability and volatile organic compound production) during model Cheddar production and ripening in comparison to *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10.

### 3.4 Material and methods

#### 3.4.1 Strains, culture conditions and viable counts

For the model Cheddar cheese production (Pearce activity test and cheese slurry), the two NSLAB strains selected in this study were *L. plantarum* RKG 2-212, a strain collected in bulk tank raw milk and originating from corn silage (Gagnon et al., 2020b), and *L. delbrueckii* RKG R10 isolated after the pasteurization (73 °C for 16 s) of bulk tank raw milk. The starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 was used in the model Cheddar cheese production (Pearce activity test and cheese slurry). Three reference strains were used for the evaluation of thermoresistance: *L. plantarum* ATCC 14917, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, and *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257. Lactobacilli strains were cultured in MRS broth (MilliporeSigma, St. Louis, MO) at 37°C and *Lactococcus* strains were cultured in Elliker broth (HiMedia Laboratories LLC, West Chester, PA). Viable counts were performed after the dilution of the sample in peptone water containing 1 g/L of Bacto Peptone (BD Biosciences, San Jose, CA). The dilutions were plated on M17 agar (Oxiod, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) incubated at 30°C for *Lcc. lactis* counts, on MRS agar supplemented with 4 mg/L of ciprofloxacin (MilliporeSigma) incubated at 37°C for *L. plantarum* counts, and on MMV agar (Di Lena et al., 2015), and MRS

based medium where glucose was replaced by 10 g/L of maltose (MilliporeSigma) incubated at 37°C for *L. delbrueckii* counts.

### 3.4.2 Genome sequencing

The DNA of *L. delbrueckii* RKG R10 and *L. plantarum* RKG 2-212 extracted as described by Gagnon et al. (2020b) were sent to Op+lait bio-informatic platform (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada). The genomes were sequenced with Illumina MiSeq platform (paired-end 150-bp reads). The annotation of the scaffold was performed with PATRIC RASTtk-enabled Genome Annotation Service (Brettin et al., 2015). This service provided a phylogenetic analysis including reference genomes selected by NCBI. The whole genomes of reference strains were used for the comparison of genes related to thermoresistance.

### 3.4.3 Thermoresistance assay

The thermoresistance of the strains in milk was evaluated as described by Teles Santos et al. (2016). After two subcultures, the overnight culture was centrifuged at 10 000 × g for 10 min at 4°C. The pellet was washed twice with phosphate-buffered saline solution (pH 7.4; Thermo Fisher Scientific). Then, the harvested cells were suspended in 10-mL sterile reconstituted milk made with 12% low heat skim milk powder (local supplier, QC, Canada). Viable counts were performed before and after the milk was placed in a water bath at 60°C for 5 min and cooled in an ice bath for 10 min.

### 3.4.4 Model Cheddar production

#### 3.4.4.1 Pearce activity test

The simulation of Cheddar manufacture (excluding the ripening period) was performed according to Gagnon et al. (2020a). Briefly, microfiltered milk containing 3.25% fat (local supplier, ON, Canada) were inoculated with the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 at 10<sup>7</sup> cfu/mL, and with the NSLAB *L. delbrueckii* RKG R10 or *L. plantarum* RKG 2-212 at 10<sup>6</sup> cfu/mL. Non-inoculated milk was used as negative control. The test lasted a total of 6 h. Calcium chloride and rennet (Fromagex, Rimouski, QC, Canada) were added at 50 min and 70 min, respectively. The curd was cooked at 38°C from 150 to 180 min, then it was drained. The salting with sodium chloride (Thermo Fisher Scientific) at 2% (w/w) was performed at 285 min. Samples for pH determination (1 g), viable counts (1 g), and PMA-qPCR procedure (1 g) were taken at 15, 70, 180, 255, 285, and 360 min. For viable counts and PMA-qPCR, the samples were mixed 1:10 with 2% (wt/vol) sodium citrate (VWR International, Radnor, PA) for 5 min at 260 rpm in Stomacher 400 Circulator (Seward Laboratory Systems Inc., Bohemia, NY).

### 3.4.4.2 Cheese slurry

The ripening step was modeled with Cheddar cheese slurry. It was performed as described by Desfossés-Foucault et al. (2014). Briefly, unsalted fresh Cheddar curd produced by Saint-Hyacinthe Research and Development Center (Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, QC, Canada) was lyophilized and grated. The resulting powder was irradiated at 5000 Gy to inactivate all bacteria and nucleic acids. After two subcultures in Elliker or MRS broth, the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (22°C) and the NSLAB *L. delbrueckii* RKG R10 or *L. plantarum* RKG 2-212 (37°C) were grown in microfiltered milk for 16 h. Then, the right amount of culture was centrifuged at 10 000 × g for 10 min at 4°C corresponding to 10<sup>8</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/g for the starter and the NSLAB, respectively. Cheese slurry samples were obtained by mixing the bacterial culture pellet and the curd powder (300 g) with saline 5% wt/vol (150 mL). The cheese slurry samples were transferred in sterile headspace vials and flushed with nitrogen. In order to model a 6-month ripening at 4°C, the vials were incubated at 30°C for 12 days. Samples (5 g) were taken at 0, 3, 6, 9, 12 d for viable counts and PMA-qPCR. The samples were treated as described in section 2.3.1. Other samples (10 g) were taken for pH measurement and the analysis of the volatile compounds at 0, 6 and 12 d.

### 3.4.4.3 DNA extraction and PMA-qPCR

The samples taken during the simulation of Cheddar manufacture were centrifuged at 12 000 × g for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded, and the fat layer was removed with a sterile swab. The cell pellet was treated with PMA (Biotium, Fremont, CA) as described by Gagnon et al. (2015). DNA extraction was performed with DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with an additional step of enzymatic lysis. First, 20 mg/mL of lysozyme and 50 U/mL of mutanolysin (MilliporeSigma) were added in the PF1 buffer. This enzymatic solution (450 µL) was used to lyse the cells with incubation at 37°C for 1 h. Then, 25 µL of proteinase K (MilliporeSigma) at 20 mg/mL was added, followed by incubation at 55°C for 1 h. Further steps were performed according to the manufacturer's protocol. The DNA was conserved at -20°C until quantification performed with ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). The 10-µL reaction volume contained 3.6 µL of nuclease-free water, 5 µL of Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.2 µL of forward and reverse 10 µM primer (Table 3.1), and 1 µL of DNA. The primers targeting *L. delbrueckii* RKG R10 were designed with Geneious R6 software (Biomatters, San Francisco, CA) based on RNA polymerase β subunit gene (*rpoB*). The run method was one cycle at 50°C for 2 min, one cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles with denaturation at 95°C for 15 s and primer annealing and DNA extension at 60°C for 1 min, followed by a melting curve stage. Viable cell quantification was obtained with standard curves performed with pure cultures of each strain spiked in reconstituted milk as described by Gagnon et al. (2015). The threshold cycle results were plotted against the corresponding viable count (cfu/mL).

**Table 3.1.** Primers used for PMA-qPCR

Target	Sequence (5' → 3') <sup>1</sup>	Amplicon size (bp)	Reference
<i>Lactococcus</i> (rRNA 16s)	F: GAG GCA GCA GTA GGG AAT CTT C R: CTT GAT GAG CTT TCC ACT CTC A	133	(Desfossés-Foucault et al., 2012)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ( <i>rpoB</i> )	F: GTT ATC TCT GAA GTT GAC GGT G R: GAT CTT GCC CTT AAC AGT GAT TTC C	87	This study
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ( <i>recA</i> )	F: AGG CGC GGC TGA TGT CA R: CGC GAT TGT CTT GGT TTT GTT	68	(Stevenson et al., 2006)

<sup>1</sup>F: forward; R: Reverse

#### 3.4.4.4 Volatile compound analysis

The volatile compounds were collected from a 10-g crumbled cheese slurry sample placed in a glass tube. As described by Goulet et al., (2012), air filtered through a hydrocarbon trap (Agilent, Palo Alto, CA) flowed through the tube for 1h. The HayeSep Q column (Agilent) trapped the volatiles, latter on eluted with methylene chloride (Thermo Fisher Scientific). Nonyl acetate (Thermo Fisher Scientific) was used as an internal control. Volatile compounds in each sample were quantified by GC with Agilent 7890B coupled with a flame ionization detector using a DB-5 column. The carrier gas was hydrogen. The GC oven was initially at 35°C, then after 1 min the temperature was ramped at 6°C/min until 250°C. This temperature was kept for 2 min. The area under the curve (AUC) of each compound was quantified. Volatile peaks were identified by GC-MS (GC Agilent 7890B coupled with MSD Agilent 5977) using a DB-5MS UI column and helium as carrier gas. The GC oven was initially at 35°C, after 1.46 min the temperature was ramped at 6°C/min until 47°C, then at 10°C/min until 250°C, and kept at 250°C for 3 min. The MS source was at 230°C and the quadrupole was at 150°C. The reading was performed at 3.125 u/s.

#### 3.4.5 Statistical analysis

The bacterial counts (viable counts and PMA-qPCR) were compared with Student's *t*-test or ANOVA for data corresponding to a normal distribution with equal variance. The multiple comparisons of the means were performed with Tukey Honestly Significant Difference test... A principal component analysis (PCA) was performed on all volatile compounds extracted and quantified from cheese slurry samples. These statistical analyses were performed with JMP 14 software (SAS Institute, Cary, NC). The effect of time and strains on volatile compounds was evaluated by linear regression model performed in the R environment (R Core Team, 2013). PostHoc analyses were performed using the function *emmeans()* of the R package Emmeans (v1.5.2-1) with false discovery rates (FDR) correction.

## 3.5 Results

### 3.5.1 Comprehensive genome analysis

The genomes of *L. plantarum* RKG 2-212 and *L. delbrueckii* RKG R10 were sequenced (Table 3.2). The comparison of metabolic reconstruction compared the functioning parts of the two NSLAB. *L. delbrueckii* RKG R10 and *L. plantarum* RKG 2-212 had respectively 167 and 193 subsystems (set of proteins that fulfill a specific biological process or a structural complex). The classification of these subsystems and the circular view of the genome are presented in the supplementary material (Supplemental Figures B1 and B2). The phylogenetic analysis revealed that *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 isolated from Bulgarian yogurt is the closest relative to *L. delbrueckii* RKG R10. The strain *L. plantarum* RKG 2-212 is closely related to *L. plantarum* L31-1 (origin unknown) and WCFS1 isolated from human saliva. Regarding their fermentative metabolism, the two NSLAB genomes encoded genes for the enzymatic machinery to ferment D-glucose to L-lactate via the glycolysis such as the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (Supplemental Figure B3). The two NSLAB could also be facultatively heterofermentative as they possessed a key enzyme, the phosphoketolase, that converts xylose-5-phosphate in acetylphosphate (Supplemental Figure B4). This compound is later transformed into acetate by acetate kinase (Supplemental Figure B5). The genome of *L. plantarum* RKG 2-212 contained a *pln* locus (Figure Supplemental B6). Of the 24 genes contained in that loci, six genes (*plnE*, *plnF*, *plnJ*, *plnK*, *plnA*, and *plnN*) code for putative bacteriocin precursor peptides. The genes related to heat, acid and osmotic stress responses are presented in Tables 3.3 and 3.4.

**Table 3.2.** General characteristics of genomes of the non-starter lactic acid bacteria *Lactobacillus delbruekii* RKG R10 and *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212.

	RKG R10	RKG 2-212
Genome length (bp)	1,938,249	3,198,778
Contigs	132	34
Guanine and cytosine content (%)	49.84	44.55
Coding sequence	2,011	3150
tRNA	66	63
rRNA	7	2
Hypothetical proteins	532	940
Proteins with functional assignments	1,479	2,210
Subsystem	167	193
Antibiotic resistance gene	20	27

**Table 3.3.** The occurrence of genes related to heat and cold stress response contained in genomes of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and ATCC 19257, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 and ATCC 11842, and *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 and ATCC 19417.

Subsystem	Gene symbol	Product <sup>1</sup>	SK11	ATCC 19257	RKG R10	ATCC 11842	RKG 2-212	ATCC 19417
Heat shock cluster extended	<i>rdgB</i>	Nucleoside 5'-triphosphatase (dHAPTP, dITP, XTP-specific) (PGF_00026362)	1	1	1	1	2	2
	<i>leP</i> A	Translation elongation factor (PGF_00060414) 16S rRNA (cytidine(1402)-2'-O)-methyltransferase (PGF_03215471)	1	1	1	1	1	1
	<i>dnaJ</i>	Chaperone protein (PGF_10301134)	1	1	1	1	1	1
	<i>dnaK</i>	Chaperone protein (PGF_10357457)	1	1	1	1	1	1
	<i>yabA</i>	DNA replication initiation control protein YabA (PGF_00421807)	1	1	1	1	1	1
	<i>grpE</i>	Heat shock protein (PGF_03751823)	1	1	1	1	1	1
	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor (PGF_01867628)	1	1	1	1	1	1
	<i>prmA</i>	Ribosomal protein L11 methyltransferase (PGF_00048840)	1	1	1	1	1	1
	<i>smpB</i>	tmRNA-binding protein (PGF_00413554) 16S rRNA (uracil(1498)-N(3))-methyltransferase (PGF_10233208)	1	1			1	1
		Phosphoesterase (PGF_09654405)	1	1			1	1
Chaperones GroEL GroES and Thermosome	<i>groES</i>	Heat shock protein 10 kDa (PGF_09581668)	1	1	1	1	1	1
	<i>groEL</i>	Heat shock protein 60 kDa (PGF_01212739)	1	1	1	1	1	1
	<i>grpE</i>	Nucleotide exchange factor GrpE (PGF_03751823)	1	1	1	1	1	1
Protein chaperones	<i>clpB</i>	Chaperone protein ClpB (ATP-dependent unfoldase) (PGF_00529632)	1	1			1	1
Translation elongation factors	<i>hsfR</i>	Ribosome-associated heat shock protein implicated in the recycling of the 50S subunit (PGF_00048932)	1	1	1	1	1	1
Cold shock proteins of CSP family	<i>cspB</i>	Cold shock protein (PGF_02049468)	3	4	1	1		
	<i>cspC</i>	Cold shock protein (PGF_02049468)	2	2			1	1
	<i>cspL</i>	Cold shock protein (PGF_02049468)						2
	<i>cspP</i>	Cold shock protein (PGF_02049468)						1
		Cold shock protein analog						1
Other	<i>clpC</i>	Class III stress response-related ATPase (PGF_03999196)	1	1	1	1	1	1

<i>ctsR</i>	Transcriptional regulator (PGF_03889881)	1	1		1	1
<i>ftsH</i>	Cell division-associated, ATP-dependent zinc metalloprotease (PGF_06275407)	1	1	1	1	1
<i>htrA</i>	Serine protease (PGF_01162199)	1	1	1	1	1
<i>tig</i>	Cell division trigger factor (PGF_02452671)	1	1	1	1	1
<i>hsp</i>	Small heat shock protein (PGF_02008725)			1	1	
<i>hsp1</i>	Small heat shock protein (PGF_02973402)					1
<i>hsp2</i>	Small heat shock protein (PGF_02046423)					1
<i>hsp3</i>	Small heat shock protein (PGF_01075339)					1
<i>htpX</i>	Heat shock protein (PGF_01405081)	2	2	1	1	

<sup>1</sup>PGF: PATRIC Global Family containing the gene (cross-genera family).

**Table 3.4.** The occurrence of genes related to acid stress, osmotic stress and general stress responses contained in the genome of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10, and *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212.

Stress	Subsystem	Gene symbol	Product <sup>1</sup>	SK11	R10	2-212
Acid stress	Other		ADP-ribose pyrophosphatase (PGF_07808527; 08110123; 02048802)	1	2	3
			Arginine deiminase (PGF_02462544)	2	1	0
			Carbamate kinase (PGF_02806641)	2	1	0
			Ornithine carbamoyltransferase (PGF_02346669)	2	1	1
		<i>msmE</i>	Multiple sugar ABC transporter, substrate-binding protein (PGF_03128213)		1	
		<i>msmF</i>	Multiple sugar ABC transporter, permease protein (PGF_01074106)		1	
		<i>msmG</i>	Multiple sugar ABC transporter, permease protein (PGF_02933767)		1	
			Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (PGF_00821117)	1	1	1
		<i>pstA</i>	Phosphate ABC transporter, permease protein (PGF_01072302)	1	1	1
		<i>pstB</i>	Phosphate ABC transporter, ATP-binding protein (PGF_06213055)	2	1	2
		<i>pstC</i>	Phosphate ABC transporter, permease protein (PGF_02405545)	1	1	1

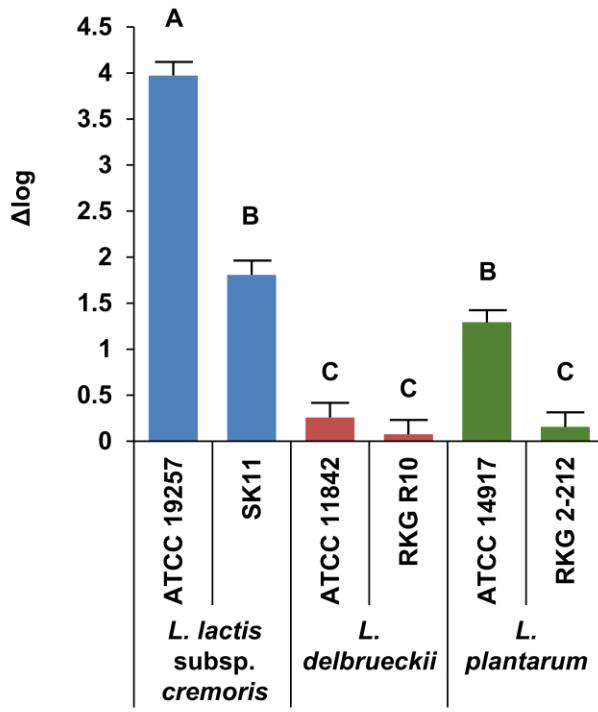
		<i>pstS</i>	Phosphate ABC transporter, substrate-binding protein (PGF_07668761)	2	1	2
		<i>yjhB</i>	Putative ADP-ribose pyrophosphatase (PGF_02800136)		1	
Osmotic stress	Choline uptake and conversion to betaine clusters	<i>opuBA</i>	Betaine/carnitine/choline transporter family (PGF_01668710)		1	
		<i>opuBB</i>	Choline ABC transport system, ATP-binding protein (PGF_08674505)	2	1	
		<i>opuBC</i>	Choline ABC transport system, permease protein (PGF_00027664)	1	1	
		<i>opuBD</i>	Choline ABC transport system, choline-binding protein (PGF_07298229)	1	1	
		<i>opuAA</i>	Glycine betaine ABC transport system, ATP-binding protein (PGF_03985749)	1	1	1
		<i>opuAB</i> / <i>opuAC</i>	Glycine betaine ABC transport system, permease protein OpuAB/ Glycine betaine ABC transport system, glycine betaine-binding protein OpuAC (PGF_08245073)	1	1	1
	Osmoregulation	<i>glpF6</i>	Aquaporin Z (PGF_01427545)		1	
	Other		Cell surface protein precursor (PGF_00069685; 00140842; 00343049; 00417220; 00417221; 00417222; 02007530; 02010526; 02011518; 02049361; 02052183; 03125342; 08225224; 12783199)	4	1	9
Stress response	Glutathione: Biosynthesis and gamma-glutamyl cycle	<i>osmC</i>	Peroxiredoxin osmotically inducible protein C (PGF_00027597; 03383443)	1		1
			PTS system, beta-glucoside-specific (PGF_04512237; 08037580; 06086613)	2		5
		<i>murG</i>	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase (PGF_03295331)	1	1	1
		<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase (PGF_04521913)	1	1	1
		<i>gshF</i>	Glutathione biosynthesis bifunctional protein gshF (PGF_00008457)		1	
Stress response	Other		ATP synthase F0 subunit A (PGF_08518355)	1	1	1
			ATP synthase F0 subunit B (PGF_10546429)	1	1	1
			ATP synthase F0 subunit C (PGF_10444145)	1	1	1

	<i>recF</i>	DNA recombination and repair protein (PGF_10387199)	1	1	1
	<i>recO</i>	DNA recombination and repair protein (PGF_06216244)	1	1	1
	<i>uvrA</i>	Excinuclease ABC subunit A (PGF_04041316)	1	1	1
		Excinuclease ABC subunit A paralog (PGF_00424968)			2
	<i>uvrB</i>	Excinuclease ABC subunit B (PGF_00950554)	1	1	1
	<i>uvrC</i>	Excinuclease ABC subunit C (PGF_00424971)	1	1	1
Universal stress protein family	<i>usp</i>	Universal stress protein family (PGF_05947556; 02039939; 05807045)	5	2	9

<sup>1</sup>PGF: PATRIC Global Family containing the gene (cross-genera family).

### 3.5.2 Thermoresistance

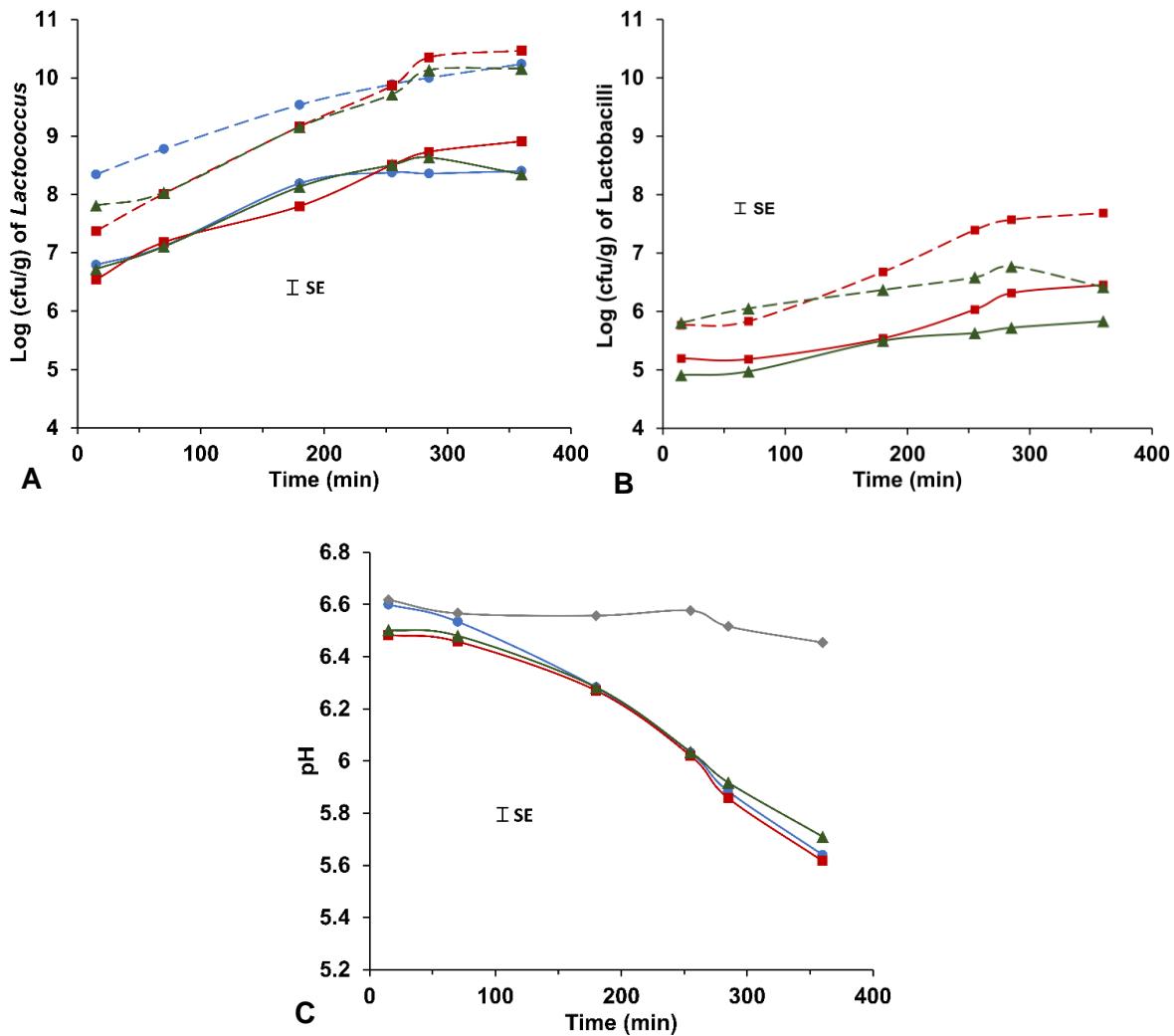
The thermoresistance level in milk was different among the strains tested (Figure 3.1). *L. delbrueckii* RKG R10 and ATCC 11842, and *L. plantarum* RKG 2-212 were the most heat-tolerant ( $F$ -value: 102.28;  $P < 0.0001$ ). These strains had lost less than one log cfu/mL after the heat treatment. The strains *L. plantarum* ATCC 14917 and *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 lost around 1.5 log cfu/mL. The strain *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257 was the most sensitive strain with 4 log cfu/mL less viable counts after the heat treatment. The occurrence of genes related to temperature stress response was different according to the strain (Table 3.3). The genomes of the three most thermoresistant strains had more genes coding for heat shock proteins (HSPs and HtpX). In contrast, most heat-sensitive strains had more genes coding for cold shock proteins (CSPs). A gene analog to *cspL* was present in *L. plantarum* RKG 2-212 (PATRIC ID: fig|1590.1627.peg.2892). This 240-bp gene corresponded to 96% of *cspL* gene of *L. plantarum* WCFS1 (Lp\_0031).



**Figure 3.1.** Viability loss after heat treatment (60°C for 5 min) of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Lactobacillus plantarum* strains expressed in  $\Delta\log$  ( $\log \text{cfu/mL}$  before heat treatment –  $\log \text{cfu/mL}$  after heat treatment). The error bars are corresponding to standard error. Means with distinct capital letters were significantly different ( $P < 0.0001$ ).

### 3.5.3 Bacterial activity during Pearce activity test

The starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 grew well during the Pearce activity test and gained 2 log cfu/g at the end (Figure 3.2A). The two NSLAB strains did not inhibit nor improve the growth of the starter as there was no significant difference between *L. lactis* SK11 alone or in coculture with *L. delbrueckii* RKG R10 or *L. plantarum* RKG 2-212 after 360 min (F-value: 1.29;  $P = 0.34$ ). The two NSLAB grew less (< 1 log CFU/g) than the starter (Figure 3.2B). The viable count of *L. delbrueckii* RKG R10 at 285 and 360 min was significantly higher than that of *L. plantarum* RKG 2-212 (285 min:  $P < 0.01$ ; 360 min:  $P < 0.01$ ). After the salting step at 285 min, the growth of the starter and the NSLAB was reduced (Figure 3.2). The PMA-qPCR counts were always higher than the viable counts, indicating the presence of VBNC cells. There was a reduction of PMA-qPCR counts between the salting step and the end of the test at 360 min only for the strain *L. plantarum* RKG 2-212. The starter SK11 acidified the milk from pH 6.53 to 5.66 (Figure 3.2C). The acidification curves were not different when the starter was alone or in coculture with the two NSLAB but was significantly lower than the control without inoculation (F-value: 43.93;  $P < 0.0001$ ).

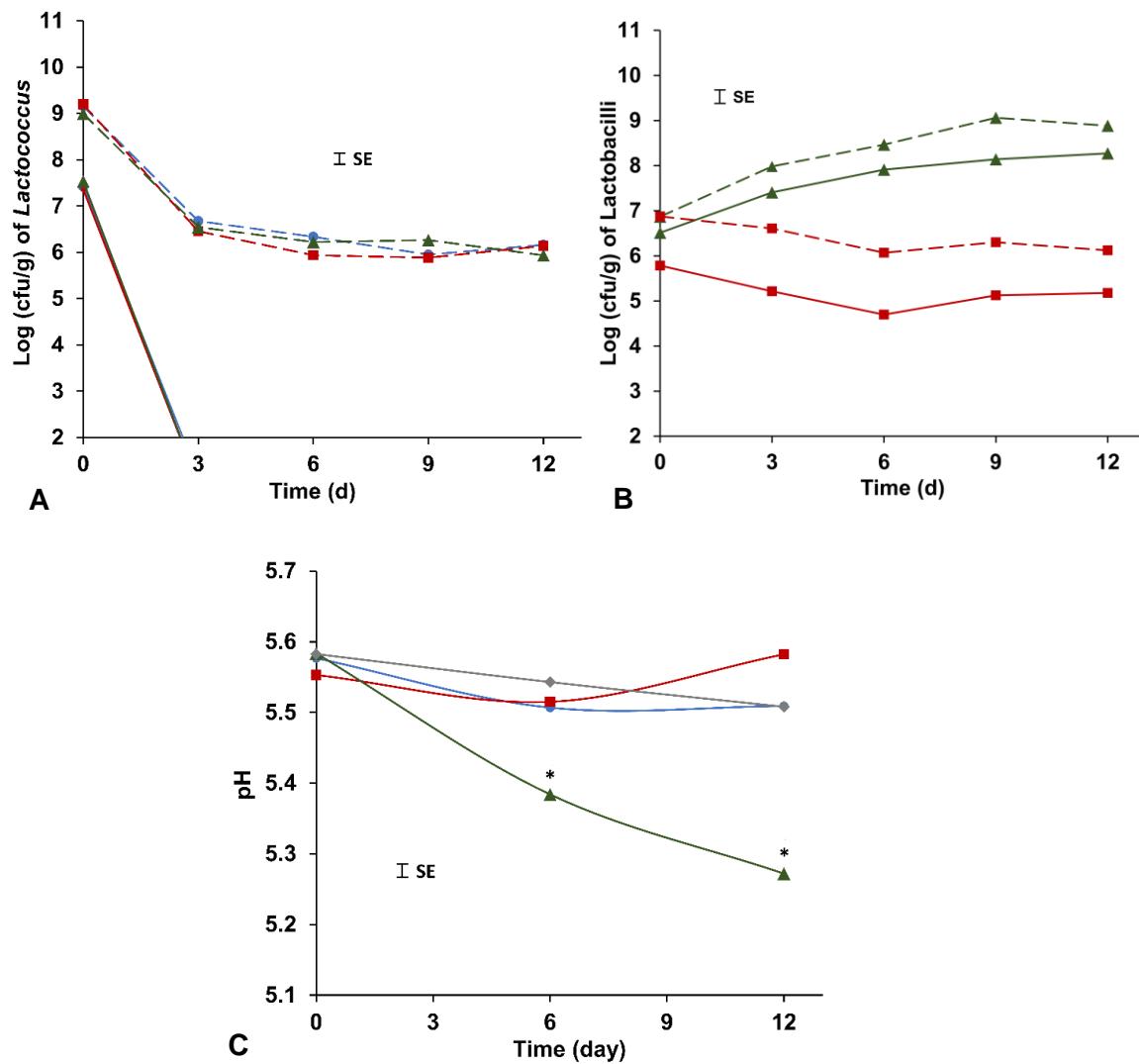


**Figure 3.2.** Cell concentrations determined by viable counts (solid line) and by PMA-qPCR (dashed line) and acidification curve during Pearce activity test for the starter *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 single strain (●), in coculture with *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 (■) or *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 (▲), and the control without inoculation (◆). A) *Lactococcus* counts, B) *Lactobacilli* counts, and C) pH values. The error bars represent the standard error (SE).

### 3.5.4 Bacterial activity in cheese slurry

As for the Pearce activity test, the viable counts of the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 were similar when it was alone or in coculture with the two NSLAB in the cheese slurries ( $P > 0.05$ ; Figure 3.3A). The starter viable count rapidly decreased in the first 3 d of ripening. After these 3 days, the viable counts were under the detection limit ( $<10^2$  cfu/g). In contrast, the viable cells of the starter estimated by PMA-qPCR quickly decreased by 2 log cfu/g but remained stable at 6 log cfu/g until the end of ripening. The viable counts of *L. delbrueckii* RKG R10 showed a small decrease in the population (Figure 3.3B). The PMA-qPCR counts were

greater but depicted the same viability decreased as viable counts. The strain *L. plantarum* RKG 2-212 had shown a completely different behavior compared to the starter and the other NSLAB. Indeed, it has grown by 2 log cfu/g during the 12 d of ripening. The PMA-qPCR counts showed similar results. The cheese slurry was not acidified by the starter alone or in coculture with *L. delbrueckii* RKG R10 (Figure 3.3C). However, the presence of *L. plantarum* RKG 2-212 significantly decreased the pH at 6 d ( $F$  value: 16.32;  $P < 0.001$ ) and 12 d ( $F$  value: 54.42;  $P < 0.0001$ ). The pH of this slurry went from 5.58 to 5.27.



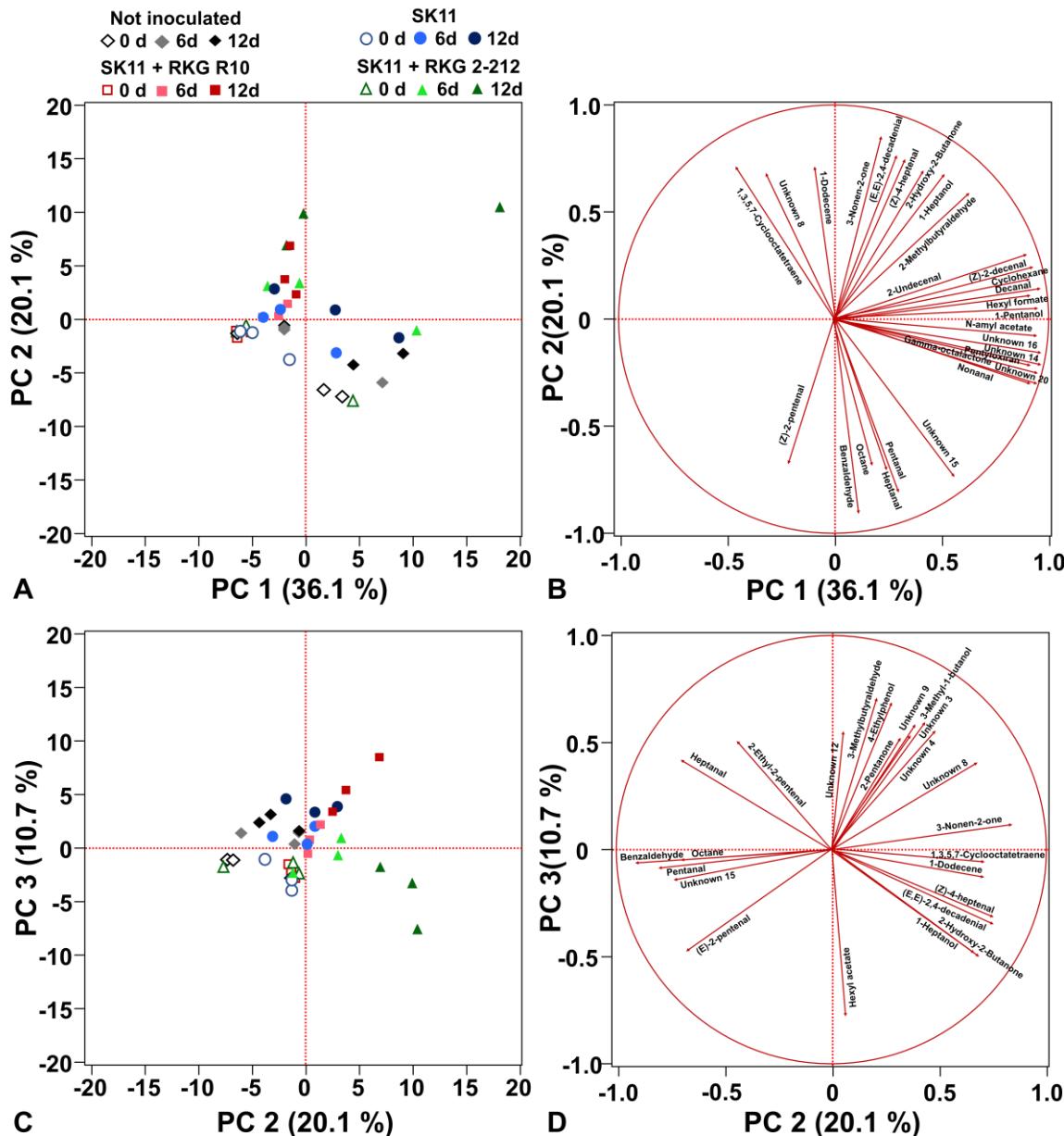
**Figure 3.3.** Cell concentrations determined by viable counts (solid line) and by PMA-qPCR (dashed line) and acidification curve in cheese slurry for the starter *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 single strain (●), in coculture with *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 (■) or *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 (▲), and the control without inoculation (◆). A) *Lactococcus* counts, B) *Lactobacilli* counts, and C) pH values; means showing significant differences are highlighted with an asterisk ( $P < 0.001$ ). The error bars represent the standard error (SE).

### 3.5.5 Volatilome analysis in cheese slurry samples

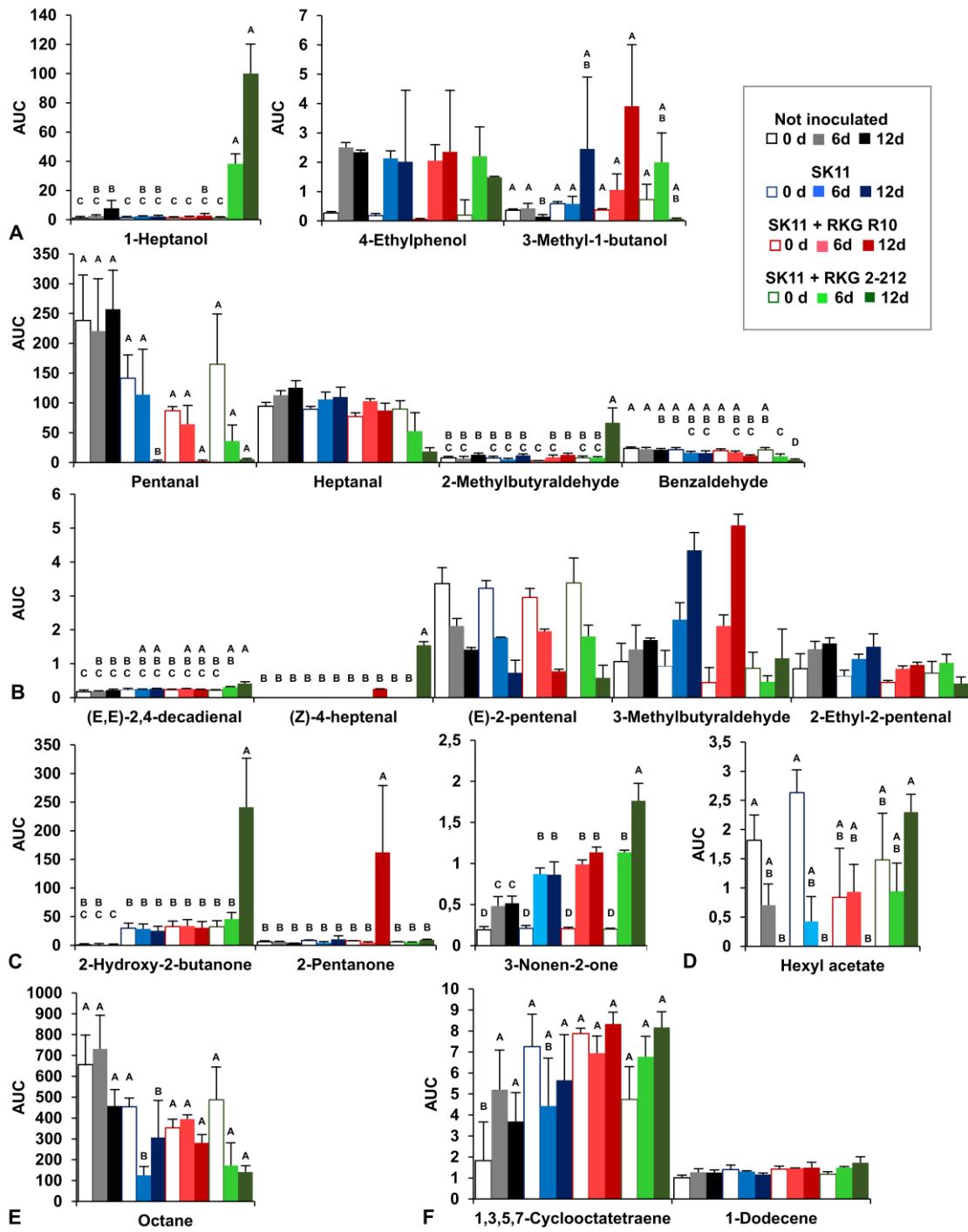
A total of 88 volatile compounds was quantified, corresponding to 7 alcohols, 23 aldehydes, 8 alkanes, 5 alkenes, 1 diol, 6 esters, 11 ketones, 2 lactones, 1 nitrile, 1 oxide, 1 phenol, and 21 unidentified compounds (Supplemental Table B1). The PCA illustrated the distribution of the volatile compound profile in cheese slurry samples by inoculation conditions and time of ripening (Figure 3.4A and C). The loading plots (Figure 3.4B and D) showed the volatile compounds contributing the most to these principal components (> 2.5%). The first principal component (PC 1) explaining 36.1% of the variation between samples (Figure 3.4A). The PC 1 showed a high variation between biological replicates as it did not separate the samples by ripening conditions (inoculation status and ripening time). The second and third principal components, PC 2 and PC 3 accounted for 20.1% and 10.7% of the variation respectively (Figure 3.4C). The PC 2 separated the samples by ripening time. The more the ripening time increase, the more the samples are far on to the right, even for non inoculated samples. On the PC 3 axis, the slurries at 12 d of ripening are grouped according to their inoculation status. Indeed, the variations in volatile compound profiles grouped the slurry samples containing the starter in coculture with *L. plantarum* RKG 2-212 at 12 d. The inoculation with the starter in coculture with *L. delbrueckii* RKG R10, also changed the profile. However, these samples are more similar to those inoculated only with *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11.

The AUC of volatile compounds contributing the most (> 2.5%) to the second and third principal components were compared for each type of cheese slurry (Figure 3.5) There were significant effects of time, inoculation, and interaction of both parameters on some volatile compounds (Supplemental Table B2). The concentration of (E)-2-pentenal tended to decrease during ripening independently of inoculation (AUC at 0 d: 3.37; at 12 d 1.14) (Figure 3.5B). The inoculation with *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* alone or in coculture induced a change in the profile of volatile compounds. For example, only the non inoculated slurry samples contained a low concentration of 2-hydroxy-2-butanone (AUC for not inoculated slurry: 0.783), also known as acetoin (Figure 3.5C). Inoculation with *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* alone decrease the amount of pentanal (Figure 3.5B). The content of 3-methylbutyraldehyde tended to increase with time in cheese slurry sample inoculated with the starter alone or in coculture with *L. delbrueckii* RKG R10 (AUC at 12 d inoculated with SK11 and SK11 + RKG R10: 4.71) .. The NSLAB *L. delbrueckii* RKG R10 significantly increased the amount of 2-pentanone. The cheese slurry samples inoculated with the starter in coculture with *L. plantarum* RKG 2-212 contained significantly greater amounts of 1-heptanol, 2-methylbutyraldehyde, (Z)-4-heptenal, 3-Nonen-2-one, and 2-hydroxy-2-butanone (Figure 3.5A, B, and C). As for hexyl acetate, this compound tended to decrease during ripening, except when cheese slurry samples contained *L. plantarum* RKG 2-212 (Figure 3.5D). This NSLAB tended to increase the amount of 1-dodecene (AUC at 0 d: 1.18; at 12 d: 1.73 ) and (E,E)-2,4-decadienal (AUC at 0 d: 0.22; at 12 d: 0.41). Also, *L. plantarum* RKG 2-212 decreased significantly benzaldehyde and tended to decrease

heptanal (AUC at 0 d: 89.79; at 12 d: 18.52), and 2-ethyl-2-pentenal (AUC at 0 d: 0.72; at 12 d: 0.41). Few acids (propionic, butyric, valeric, hexanoic, and octanoic acids) were detected by GC-MS, but no recognizable peaks were quantified by GC. Acetic acid was observed by GC, but overloading interfered with the quantification (Figure B7). Importantly, acetic acid was only detected in Cheddar slurry samples containing *L. plantarum* RKG 2-212 after 12 days.



**Figure 3.4.** Principal component analysis of the volatile compounds in cheese slurry samples without inoculation (♦) or inoculated with the starter *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 single strain (●), and in coculture with *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 (■) or *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 (▲). A) and C) Score plots, and B) and D) loading plots of the first three components.



**Figure 3.5.** Area under the curve (AUC) of volatile compounds: A) alcohols and phenol, B) aldehydes, C) ketones, D) ester, E) alkane, and F) alkenes contributing the most to the second and third principal components extracted from cheese slurry samples without inoculation or inoculated with the starter *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 single strain and in coculture with *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 or *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 ripened for 0 to 12 days. The error bars correspond to standard error. For each compound, means with distinct capital letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 3.6 Discussion

Milk heat treatments such as thermization and pasteurization, are common in commercial cheese manufacturing, especially for Cheddar produced in large-scale plants (Fox et al., 2017a). Therefore, NSLAB in raw milk need to be thermostable to be found in these kinds of cheese. The strain *L. plantarum* RKG 2-212 originating from corn silage could probably resist to pasteurization and end up in cheese production as it showed the same thermostability as *L. delbrueckii* RKG R10. We have also demonstrated that *L. plantarum* RKG 2-212 had a better thermostability than the two *Lactococcus* and *L. plantarum* ATCC 14917. Moreover, *L. plantarum* strains isolated from the cocoa fermentation process characterized by Teles Santos et al. (2016) was also less thermostable. The Δlog evaluated by the same protocol as our study was 3.39 log for the most tolerant strain and 2.21 log for the most sensitive one. The strain origin could explain a part of this resistance. Indeed, it is known that previous heat shock or other stresses can induce a physiological adaptation such as chaperone activity and ribosome stability (De Angelis and Gobbetti, 2004; De Angelis et al., 2004). The temperature of silage can increase (by over 5°C) during exposure to air in case of aerobic instability (Wilkinson and Davies, 2013). Moreover, silage in eastern Canada endures a wide range of temperature (-30 to +30°C) and potentially could confer to LAB the ability to resist to heat treatment in milk. The heat stress response in *Lactobacillus* is characterized by an increased synthesis of HSPs (De Angelis and Gobbetti, 2004). This is in agreement with our study as strains with a greater number of *hsp* copies had a better thermostability. It was demonstrated that heat stress increased transcription of CSP and could enhance thermostability (Taïbi et al., 2011). Such mechanism was not apparent in the present study, as the higher occurrence of *csp* was not linked to a better thermostability.

During the Pearce activity test, the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 population had a greater increase than in a similar experiment performed by Desfossés-Foucault et al. (2014). However, in the present study the starter was inoculated at a lower concentration ( $10^7$  instead of  $10^8$  cfu/mL of milk). The biomass before inoculation is known to have a certain level of acidity. Therefore, a high level of inoculation could slow down bacterial growth. This acidity, as it can induce a VBNC state (Wasfi et al., 2020), could also explain the presence of VBNC, when the inoculation was performed at the beginning of the Pearce activity test and cheese slurry ripening. However, it was demonstrated in a model cheese experiment that final cell numbers at the end of cheese production were not determined by the cell numbers at inoculation (Jeanson et al., 2011). The two NSLAB did not affect the growth of the starter neither did they produce an over-acidification during model Cheddar production, excluding the ripening period. Similar results were obtained in model Cheddar production or real production with the co-inoculation of a *Lactococcus* starter with *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 334, *Lacticaseibacillus rhamnosus* RO011, *Lactobacillus helveticus* RO052, and *Bifidobacterium lactis* subsp. *animalis* BB-12 (Desfossés-Foucault et al., 2012, 2014).

The strain *L. delbrueckii* RKG R10 had a growth similar to *L. paracasei* ATCC 334 and *L. rhamnosus* RO011. Considering the concentration factor in cheese production by the removal of whey, the two NSLAB stayed stable during the production (viable counts gained less than 1 log cfu/mL). Other adjunct cultures such as *Enterococcus faecalis* or *Streptococcus thermophilus* exhibit much higher growth during the Pearce activity test (Gagnon et al., 2020a). Therefore, the presence of the two NSLAB did not seem to be problematic in the production of fresh Cheddar. *L. plantarum* RKG 2-212 already demonstrated an *in vitro* antibacterial effect against the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (Gagnon et al., 2020b) and its genome encoded genes to produce at least six plantaricins (A, E, F, J, K, and N) similar to *L. plantarum* WCFS1 plantaricins (Diep et al., 2009; van den Nieuwboer et al., 2016). The production of bacteriocin is highly modulated by culture environments (Venegas-Ortega et al., 2019) and *L. plantarum* RKG 2-212 probably did not produce theses bacteriocins under cheese manufacturing conditions, given the observed viability of the starter.

The model ripening (Cheddar cheese slurry) also demonstrated that the two NSLAB did not impact the activity of the starter. A rapid decrease of the viable count of starter below the detection limit was previously observed during model ripening (Desfossés-Foucault et al., 2014). It is known that the decrease in starter population, in early steps of ripening, is caused by low moisture, pH and temperature, and a high salt concentration (Blaya et al., 2018). In particular, the sensitivity to a high salt environment of *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* strains, including SK11, has already been demonstrated (Taïbi et al., 2011; Yanachkina et al., 2020). Also, the decrease in starter viability can be related to the autolysis capacity of these strains (Fox et al., 2017e). Autolysis can be seen as a process that benefits the rest of the population, as it releases nutrients and enzymes (Aertsen and Michiels, 2004). Our results demonstrated an autolysis phase until 6 days of the accelerated ripening, which was reflected by the decrease in viable as well as PMA-qPCR counts. After 6 days, the PMA-qPCR count remained stable. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 was shown to enter in a VBNC state after carbohydrate starvation while remaining metabolically active (Ganesan et al., 2007). In cheese, about 96% of the lactose from milk is removed in the whey, or used during bacterial fermentation (Fox et al., 2017b).

The population of *L. delbrueckii* RKG R10 showed a slight decrease during ripening. Arginine release during casein hydrolysis in the course of ripening can be a potential source of energy for NSLAB (Banks and Williams, 2004). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 can produce arginine during cheese ripening (Hayaloglu et al., 2005). *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 could use this substrate through the arginine deiminase pathway as it possesses the genes coding for the enzymes necessary for this series of metabolic reactions, i.e., arginine deiminase, ornithine carbamoyl-transferase, and carbamate kinase (Fox et al., 2017g). This pathway is mostly associated with obligatory heterofermentative LAB (Sohier et al., 2012), but *L. plantarum* RKG 2-212 did not have the genes for two of these enzymes (Table 3.4). The presence of *L. delbrueckii* RKG R10 in model Cheddar cheese ripening did not seem to have a major impact. Similar behavior was observed

with the strain *L. paracasei* LPC-37 used as adjunct culture in Dutch-type cheese (Bielecka and Cichosz, 2017). *L. paracasei* LPC-37 did not modify the pH through ripening. On the other hand, *L. plantarum* RKG 2-212 had a clear impact in cheese slurry samples even if this strain seemed less adapted than *L. delbrueckii* RKG R10 to Cheddar production during the Pearce activity test. More genes associated with ripening stress responses were present in the genome of *L. plantarum* RKG 2-212 (Tables 3.3 and 3.4). These genes were identified by the comprehensive analysis of genome (PATRIC service) and genes previously identified in literature (Taïbi et al., 2011; Moghaddam et al., 2017; Wu et al., 2017; Chen and Lu, 2018; Palud et al., 2018). *L. plantarum* RKG 2-212 was the only one to have glutathione biosynthesis bifunctional protein GshF. Glutathione is an antioxidant that can help to gain stress resistance (Makarova et al., 2006; Pophaly et al. 2012). This strain was probably more resistant to salt during ripening due to many genes coding for osmotic stress response proteins such as cell surface protein precursors. Indeed, a cell surface protein gene was overexpressed by *L. paracasei* ATCC 334 after exposure to salt (Palud et al., 2018). Moreover, Pieterse et al. (2005) demonstrated with *L. plantarum* WCFS1 the overexpression of cell surface protein genes after lactic acid stress. These cell surface protein precursors should be investigated more deeply to understand their function. The NSLAB *L. plantarum* RKG 2-212 also possesses the gene for aquaporin Z. Aquaporins, water-selective channels regulating the water flux through the cell, are part of osmotic stress response in LAB (Chen and Lu, 2018). Lactobacilli can also regulate osmotic pressure through the production of osmotic active compounds in their cytoplasm such as glycine betaine (Chen and Lu, 2018). Interestingly, *L. plantarum* RKG 2-212 had a gene linked to the intake system of glycine betaine (betaine/carnitine/choline transporter family) that was absent in the starter and the other NLSAB genome. Moreover, there was a higher occurrence of genes coding for the universal stress protein family in *L. plantarum* RKG 2-212. Marceau et al. (2004) reported the implication of a universal stress protein when *Latilactobacillus sakei* 23K grew in the presence of 4% NaCl. Finally, this strain could be more adapted to cheese ripening because of the presence of many genes coding for beta-glucoside-specific-PTS system. In the study by Palud et al. (2018), this gene was overexpressed by *L. paracasei* ATCC 334 after heat, ethanol, acid, salt, and oxidative stresses. A better comprehension of heat, acid and salt stress responses of *L. plantarum* RKG 2-212 could be obtained with transcriptomic or proteomic analysis. In addition to having grown during ripening, *L. plantarum* RKG 2-212 decreased the pH of the curd. This effect could be linked to the production of acetic acid. The facultative heterofermentative metabolism of this strain can explain the presence of this metabolite. This fermentation pathway can also lead to CO<sub>2</sub> production (Gänzle, 2015). *L. delbrueckii* RKG R10 also had the enzymes to be facultative heterofermentative, but the strain could be under too much stress to favor this pathway. Moreover, *L. plantarum* RKG 2-212, compared to the starter and the other NSLAB, was the only strain to have a gene coding for aldehyde dehydrogenase (NAD(+)), that can convert acetaldehyde to acetate (Figure B5). The pathway used for acetic acid production could be investigated with transcriptomic analysis. A

high acidity corresponding to excessive acid or sour taste is recognised as a flavor defect in Cheddar (Singh et al., 2003). Also, a lower pH of the curd can modify its texture and cause crumbliness (Fox et al., 2017h).

The presence of bacteria in cheese slurry samples modified the volatilome during ripening. For example, inoculation was essential to have acetoin in cheese slurry samples. This compound associated to butter flavor comes from the catabolism of pyruvate (Singh et al., 2003; Fox et al., 2017g). Pyruvate through the butanoate metabolism is transformed to α-acetolactate, then in acetoin. The starter and *L. plantarum* RKG 2-212 had the genes coding for the two essential enzymes in this pathway, i.e. acetolactate synthase and acetolactate decarboxylase, compared with *L. delbrueckii* RKG R10 lacking the acetolactate synthase. This probably explained the same concentration of acetoin extracted from cheese slurry samples inoculated with the starter alone or in coculture with *L. delbrueckii* RKG R10. It was also demonstrated for the *L. plantarum* species that under acid stress, the pyruvate metabolism was modulated to increase the synthesis of alkaline compounds such as acetoin (Gobbetti et al., 2015). This is in agreement with our results observed in cheese slurry. Overall, the strain *L. delbrueckii* RKG R10 had a limited impact on the volatile compounds profile of cheese slurry compared to *L. plantarum* RKG 2-212 (Figure 5). This could be in part explained by the growth of this strains as there was a significant interaction effect between time and strain on AUC variations for nine volatile organic compounds in slurry inoculated with the starter and *L. plantarum* RKG 2-212 at 12 d (Supplemental Table B2). The use of *L. plantarum* SKT109 as an adjunct culture has already shown the modification of volatile compounds during Cheddar ripening (Wang et al., 2018). However, these changes were not the same as those produced by *L. plantarum* RKG 2-212. As in our study, other mesophilic lactobacilli can produce 1-heptanol, such as two strains of the *L. casei* group. They increased the concentration of 1-heptanol during ripening (14 days at 37°C) of Cremoso cheese slurry (Peralta et al., 2016). Rehman et al. (2000) demonstrated that the concentration of 1-heptanol was higher in 6-month old Cheddar cheeses made from pasteurized milk than those made from raw milk. In their study, the concentration of NLSAB reached 10<sup>6</sup> cfu/g in pasteurized cheese after 6 months of ripening at 8°C. Pasteurization may have favored thermoresistant NSLAB able to produce this compound. According to the Flavornet database, 1-heptanol corresponds to chemical and green flavor (Acree and Arn, 2020). The two aldehydes extracted in greater concentration in cheese slurry samples containing *L. plantarum* RKG 2-212, 2-methylbutyraldehyde and (Z)-4-heptenal, are associated to the overall aroma of mild Cheddar (Marilley and Casey, 2004; Murtaza et al., 2014). The 2-methylbutyraldehyde is associated with dark chocolate and malt flavors. This compound is produced by isoleucine catabolism (Singh et al., 2003). The starter and the two NSLAB possessed the gene *bcaT* coding for the branched-chain amino acid aminotransferase in their genome. This enzyme is transforming isoleucine in ketoisoleucine. Then, the ketoisoleucine is degraded in 2-methylbutyraldehyde by a decarboxylase. However, this decarboxylase was not specifically identified. A high concentration of 2-methylbutyraldehyde can be linked to malty and unclean flavors, which can be considered as a defect in Cheddar cheese. The 3-methylbutyraldehyde is associated with the same defect as the 2-

methylbutyraldehyde and is produced by the degradation of leucine (Singh et al., 2003). This compound tended to be in greater concentration in cheese slurry inoculated with *L. delbrueckii* RKG-R10 than those inoculated with *L. plantarum* RKG 2-212. The growth of *L. plantarum* RKG 2-212 during ripening surely increased the isoleucine degradation. Another aldehyde increased by this NSLAB, (Z)-4-heptenal, is associated with creamy, fatty and biscuit flavors (Singh et al., 2003; Caspia et al., 2006). These flavors are appreciated in Cheddar by the consumers (Caspia et al., 2006; Drake et al., 2008). The lower concentration of benzaldehyde in slurry inoculated with the starter and *L. plantarum* RKG 2-212 could also affect the flavor as this compound associated with almond aroma contributes to the overall flavor of Cheddar (Singh et al., 2003). The NSLAB *L. plantarum* RKG 2-212 also increased the amount of 3-nonen-2-one. Methyl ketones, such as 3-nonen-2-one, are not principal contributors to Cheddar flavor (Murtaza et al., 2014). This methyl ketone is associated with river water and vapor flavor (Ubeda et al., 2012). Ubeda et al. (2012) had shown that this compound is a key component in strawberry vinegar. The 3-nonen-2-one concentration was greater in vinegar than in raw material, i.e. strawberries. Methyl ketones are produced by the oxidation of fatty acids resulting in  $\alpha$ -ketoacids; then  $\alpha$ -ketoacids are decarboxylated in a methyl ketones (Singh et al., 2003).

### **3.7 Conclusions**

In this study, the impact of two thermoresistant NSLAB strains on model production of Cheddar was demonstrated. They did not modify the production of fresh Cheddar, but they altered the volatile compounds profile in cheese slurry during ripening. The volatilome of slurry samples inoculated with the starter *Lcc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 in coculture with *L. delbrueckii* RKG-R10 was close to the samples inoculated with the starter only. However, the inoculation of cheese slurry samples with the starter in coculture with corn silage strain *L. plantarum* RKG 2-212 produced a distinct volatile compounds profile. Indeed, this strain was highly active during ripening also resulting in acidification of the curd. The genome of this strain demonstrated a higher copy number of stress response-related genes. Further works could be performed using this strain in a real Cheddar production and ripening to correlate the modification of the volatilome to perceptible organoleptic defects.

### **3.8 Acknowledgments**

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Ottawa, ON, Canada), Novalait (Quebec, QC, Canada), Agriculture and Agri-Food Canada (Ottawa, ON, Canada), and the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (Quebec, QC, Canada) for their financial contribution. They also give special thanks to the Op+Lait research group (Saint-Hyacinthe, QC, Canada) for a scholarship to Mérilie Gagnon and for access to bio-informatic platform (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada). The authors would like to thank from this platform Dr. Sébastien Rodrigue, Dr. Pierre-Étienne Jacques, Jean-François Lussier, and Frédéric Grenier for their help and support. The authors would like to thank Maxime

Bastien, a member of Dr. Charles Goulet's team for his technical assistance and scientific advice on volatile compounds analysis. The authors express thanks to all members of Dr. Roy's team, particularly Alexandre Jules Kennang Ouamba and Camille Daunizeau (Université Laval, QC, Québec, Canada).

# **Chapitre 4 – Impact de la litière à base de fumier recyclé sur le lait cru et implications pour la qualité microbiologique du fromage**

## **Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality**

Mérilie Gagnon<sup>1,2</sup>, Laurie Hamelin<sup>1,2</sup>, Annie Fréchette<sup>2,3</sup>, Simon Dufour<sup>2,3</sup>, Denis Roy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Département des sciences des aliments, Laboratoire de génomique microbienne, Université Laval, 2440, boulevard Hochelaga, Québec G1V 0A6 Canada

<sup>2</sup> Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op<sup>+</sup>Lait), 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe J2S 2M2 Canada

<sup>3</sup> Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe J2S 7C6 Canada

### **4.1 Résumé**

L'environnement de la ferme influence le microbiote du lait cru ce qui influence par conséquent la transformation de celui-ci. Il est donc crucial d'examiner le rôle de certaines pratiques de gestion à la ferme comme les matériaux servant de litière. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de l'utilisation de la litière de fumier recyclé (LFR) sur le lait de réservoir et son implication sur la qualité microbiologique du fromage. Les laits de réservoir de 84 fermes laitières utilisant la LFR ou la paille ont été collectés. L'utilisation de la LFR n'a pas eu d'influence sur les comptes de spores des bactéries aérobies thermophiles et mésophiles. Par contre, les laits associés à la litière de paille avaient un compte plus élevé pour les spores de bactérie anaérobie mésophile (0,44 log UFC/mL) que les laits associés à la LFR (0,17 log UFC/mL). La présence de bactérie lactique thermorésistante n'a pas été augmentée dans les laits des fermes utilisant la LFR. En revanche, les profils taxonomiques des bactéries thermorésistantes isolées des laits étaient différents entre les deux types de litières utilisées. Un plus grand nombre d'*Enterococcus faecalis* et de *Streptococcus* spp. a été observé dans les laits associés à la LFR. Ces entérocoques et streptocoques thermorésistants pourraient facilement se retrouver dans une production fromagère. Donc, l'activité protéolytique de ces isolats a été testée. Aucun isolat de *Streptococcus* spp. et d'*Enterococcus faecium* n'a démontré d'activité protéolytique, tandis que 53% des isolats

d'*E. faecalis* étaient protéolytiques. De plus, une seule souche d'*Enterococcus* résistante à la vancomycine a été détectée. La survie d'isolats associés à la LFR (trois *E. faecalis* et un *Streptococcus thermophilus*) a été évaluée durant la production modèle de cheddar. Bien que ces souches aient bien survécu, elles n'ont pas modifié la courbe d'acidification du lait. En revanche, elles pourraient causer des défauts organoleptiques durant l'affinage du fromage.

## 4.2 Abstract

The dairy farm environment influences the raw milk microbiota and consequently affects milk processing. Therefore, it is crucial to investigate farm management practices such as bedding materials. The aim of this study was to evaluate the effect of recycled manure solids (RMS) as bedding material on bulk tank milk and microbiological implications for cheese quality. Bulk tank samples were collected from 84 dairy farms using RMS or straw bedding. The use of RMS did not influence thermophilic and mesophilic aerobic viable counts from spores. However, straw-milk samples gave higher values for mesophilic anaerobic spore-forming bacteria (0.44 log cfu/mL) than RMS-milk samples (0.17 log cfu/mL). The presence of thermoresistant lactic acid bacteria (LAB) was not increased in milk from farms using RMS. Nevertheless, taxonomic profiles of thermoresistant bacteria isolated were different between the two types of milk. More *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus* spp. were identified in RMS-milk samples. Thermoresistant enterococci and streptococci could easily end up in cheese. Therefore, milk proteolytic activities of these isolates were tested. Neither *Streptococcus* spp. nor *Enterococcus faecium* isolates exhibited proteolytic activities, whereas 53% of *E. faecalis* showed some. Also, only one vancomycin-resistant *Enterococcus* was detected. Survival of selected RMS-milk samples isolates (three *E. faecalis* and one *Streptococcus thermophilus*) was evaluated during a model Cheddar cheese manufacture. Although those strains survived well, they did not modify the acidification curve of milk. However, they might cause organoleptic defects during cheese maturing.

## 4.3 Introduction

Dairy farm management undergoes change for practical and economic reasons or for food safety. Recently, bedding from recycled manure solids (RMS) has gained popularity in Canada. This practice is widespread in United Kingdom and has been used for several years (Bradley et al., 2014). Manure solids are separated from the liquid fraction using a screw, a roller press or high-performance slurry separation equipment (Leach et al., 2015). Manure contains a high quantity of microorganisms that would be detrimental to animal health (e.g., *E. coli* vs. mastitis). Therefore, the solid fraction is often composted to modify the bacterial populations from that of manure. The bacterial fermentation raises the temperature during this process. Anaerobic digestion is also used instead of or as well as composting commonly in the United States (Leach et al., 2015). A lot of potential benefits are associated with RMS, such as cost savings, availability, and cow comfort

(Bradley et al., 2014; Fournel et al., 2019b). Also, this type of bedding can be considered as a strategy to mitigate pollution from livestock manure management (Petersen et al., 2007). However, using RMS includes some risks (Bradley et al., 2014). Among others, it can contain an important load of gram-negative pathogens (*Klebsiella*, for instance) or food spoilage microorganisms surviving to pasteurization such as spore formers and thermoresistant bacteria (Sorter et al., 2014; Leach et al., 2015).

It was demonstrated that dairy farm environment influences milk microbiota (Vacheyrou et al., 2011; Skeie et al., 2019). For example, thermoduric spore-forming bacteria in milk can come from soil, silage or bedding. A higher number of thermophilic spore-forming bacteria was observed in bulk tank milk of farms using biobedding from composted material such as municipal biowaste or wooden chips than farms using sawdust or straw (Driehuis et al., 2014). The principal spore formers in milk are *Clostridium* (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum*), *Bacillus* (*Bacillus cereus* and *Bacillus sporothermodurans*), and *Geobacillus* (*Geobacillus stearothermophilus*) (Quigley et al., 2013). *Clostridium tyrobutyricum* can cause significant defects in cheese such as off-flavors and late blowing (Bassi et al., 2015; Gómez-Torres et al., 2015). As for *Bacillus* spp., they can produce hydrolytic extracellular enzymes (proteases, lipases, and lecithinases) causing spoilage in pasteurized milk (De Jonghe et al., 2010). The occurrence of the genera *Enterococcus* and *Streptococcus* in milk and cheese is also important. Indeed, environmental streptococci, including *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, and enterococci such as *Enterococcus* spp., can cause mastitis in dairy cows (Cameron et al., 2016). *Enterococcus* spp. are considered thermoresistant and are associated with the gastrointestinal tract of mammals. Enterococci are also known to be opportunist nosocomial pathogens worldwide. Their important genome plasticity allows the dissemination of antibiotic resistance genes. There is a major concern for vancomycin-resistant enterococci (VRE), but more specifically for *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* species (O'Driscoll and Crank, 2015). Moreover, enterococci are prevalent in dairy products and can have negative effects on flavor development by proteolytic and peptidolytic activities (Giraffa, 2003). *Streptococcus thermophilus* is a nonpathogenic thermophilic bacterium used in yogurt production that can have a strong acidifying activity (Shahbal et al., 1991). The rates of acidification and proteolytic activity have a critical effect on the texture of cheese (Fox et al., 2017a). In addition, some studies correlated proteolytic and acidifying activity (Giraffa, 2003). As mentioned, bacteria originating from milk can modulate cheesemaking (Fox et al., 2017e). However, to exert considerable influence, those bacteria need to survive to cheese manufacture. In pasteurized cheese production such as Cheddar, different steps can stress bacteria, for example, acidity that comes from the starter, the cooking, and the salting (Gobbetti et al., 2018). The Pearce activity test is an effective laboratory-scale Cheddar cheese simulation to assay bacteria viability (Desfossés-Foucault et al., 2014).

High concentrations of thermoduric and thermoresistant bacteria coming from milk of farms using RMS could lead to a reduced shelf life of pasteurized milk and cheese production loss. Therefore, we first investigated, under commercial farms conditions, the effect of RMS compared with straw bedding on the occurrence of spore-forming bacteria and thermoresistant LAB in bulk tank milk. Secondly, the survival, during Cheddar cheese manufacture, of selected thermoresistant strains from RMS-milk samples strains, was evaluated using a laboratory simulation process.

## 4.4 Materials and methods

### 4.4.1 Selection of herds

The design was a cross-sectional observational study where milk samples from farms using RMS or straw as bedding were compared at a single point in time. To be included in the RMS group, the farms needed to have primarily used these materials as bedding for their lactating cows for at least six months prior to the study. Almost all farms were composting the RMS prior to their usage (Table 4.1). Their herd size was between 55 and 900 cows (mean: 159; median: 111). Farms had to have their main facility within 250 km of the Faculty of Veterinary Medicine, located at the Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada). Putative participating herds were identified by contacting: 1) equipment dealers; 2) veterinary associations; and 3) via social networks. All identified farm owners using RMS were contacted and asked to participate in the study. Most of these qualified herds are also included in the regular DHI control group; however, the ones using RMS not in the latter were not excluded. Control farms (using straw as bedding) were recruited in the same area using the list provided by Valacta Inc., the Eastern Canada Dairy Herd Improvement Association. These were contacted for participation and selected based only on their exclusive use of straw bedding for the same period. Their herd size was between 43 and 229 cows (mean: 70; median: 65). A total of 84 dairy cow farms were sampled during spring 2018 (26 using RMS and 58 using straw bedding). None of these herds were provided with access to pasture during the sampling period.

### 4.4.2 Bulk tank milk sampling

Before taking the milk samples from farms using RMS (RMS-milk) and farms using straw bedding (straw-milk), the bulk tank was agitated for 5 min. Then, samples were collected by the top of the tank using a straw and a syringe that were both sterilized. Subsequently, the milk was transferred in a sterile conical tube. Whenever the bulk tank milk level was too low to perform the sampling, it was obtained through the outlet valve. A little amount of milk was discarded and then 50 mL was collected in a clean sealable bag and then transferred with a syringe into a conical tube; these last two items were previously sterilized. Raw milk was kept at 4°C until arrival at the laboratory. All samples were analyzed within 48 h.

**Table 4.1.** Information about recycled manure solids production

	Type	Number of farms
Separator	Roller press	8
	Screw press	18
Composting	Biodigester	1
	Box	13
	Tank	2
	Windrow	9
	None	1

#### 4.4.3 Enumeration and isolation of heat-resistant bacteria

To enumerate thermoduric bacteria (spore-forming bacteria), 15 mL of raw milk were heated for 10 min in a water bath at 80°C to exclude vegetative cells, then cooled in an ice bath for 10 min. The heated milk was then plated in duplicate for aerobic spore formers on Brain Heart Infusion (BHI) Agar (BD Biosciences, San Jose, CA) supplemented with 1 mg/L of vitamin B<sub>12</sub> (Millipore Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubated 24 to 48 h at 37°C (mesophilic) and 55°C (thermophilic) (Driehuis et al. 2014). For mesophilic anaerobic spore-forming bacteria enumeration, heated milk was plated on Reinforced Clostridial Medium (RCM) Agar (HiMedia Laboratories LLC, West Chester, PA) and incubated 48 to 72 h at 37°C in an anaerobic glove box (Plas-Labs Inc., Lansing, MI) containing an atmosphere of 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, and 10% CO<sub>2</sub> (Praxair Canada, Mississauga, ON, Canada; Gómez-Torres et al., 2015). After incubation, the colonies were counted, expressed as colony forming units per milliliter of milk. Second, heat treatment of raw milk was performed at 63°C for 10 min to enumerate thermoresistant *Enterococcus* and *Streptococcus* (Carminati et al., 2014). Heated milk and a 10-fold dilution in peptone water (1% of Bacto Peptone, BD Biosciences) were plated in duplicate on M17 Agar (Oxoid, Nepean, ON, Canada) at 37°C and 42°C (for *S. thermophilus*). Colony-forming units were counted after the incubation.

Colonies selected with Harrison's disc (Ricciardi et al., 2015) for each different set of culture conditions were isolated by streaking. Then, pure isolates were grown for 24 h in the same culture conditions in liquid broth media (BHI, RCM, and M17). They were also kept at -80°C in 20% (vol/vol) glycerol (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ).

#### 4.4.4 Identification of isolates

##### 4.4.4.1 DNA extraction

Genomic DNA extraction of isolates was performed with Geneaid Presto Mini gDNA Bacteria Kit (FroggaBio, Toronto, ON, Canada). One milliliter of 24-h-old culture was centrifuged at 10,000 x g, 10 min at 4°C. The cell pellet was used for the extraction. The manufacturer's protocol was modified based on Licitra et al. (2007). Briefly, to improve cell lysis, 20 mg/mL of lysozyme (Millipore Sigma) and 2.5 µL/mL of mutanolysin (20 U/µL) were added in Gram+ Buffer. Also, each incubation time in a water bath was doubled. The DNA was stored at -20°C until PCR amplification.

#### 4.4.4.2 16S rRNA gene sequencing

The 16S rRNA genes of all isolates were partially sequenced (~800 bp). The amplification was performed with the primers 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') and 788R (5'-GGACTACCAGGGTATCTA A-3') (Rasolofa et al., 2010). The reaction for one volume of 50 µL contained 200 µM of dNTP mix, 0.2 µM of each primer, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U of GeneDireX Taq DNA polymerase (FroggaBio) and 25 ng of DNA. This volume was supplemented with Invitrogen nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The nuclease-free water was also used as a blank. The amplification in TGradient (Biometra, Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada) was performed using the following program: 94°C for 5 min, 30 cycles including denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 53°C for 1 min, and DNA extension at 72°C for 2 min, and a final step also at 72°C for 5 min. Next, DNA sequence analysis was carried out on both strands of the purified PCR products with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and 3100 Genetic Analyzer System (Thermo Fisher Scientific). Sequences were aligned using Geneious Pro R6 software (Biomatters, San Francisco, CA). Identification was obtained with the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Further PCR amplifications were carried out for better identification of isolates belongs to *Enterococcus* species and *S. thermophilus* group.

#### 4.4.4.3 Identification of enterococci by multiplex PCR

*Enterococcus* multiplex PCR was performed as described by Layton et al. (2010) to identify *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus saccharolyticus* and *Enterococcus italicus*. Positive controls (*E. hirae* ATCC 10541, *E. faecium* 11G22K, *E. faecalis* ATCC 27275, and *E. durans* DSM-20633) and negative controls (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *E. italicus* DSM-15952) were used. No primer was designed for *E. italicus*. However, if isolates, identified as *E. durans/italicus* by 16S rRNA gene sequencing, were negative to the *E. durans* assay, they were assumed to belong to *E. italicus*. The PCR conditions and primers are shown in Supplemental Tables C1, C2, and C3. Nuclease-free water was used as blank. After the reaction, 5 µL of PCR products were analyzed with GD 100 bp

DNA Ladder H3 (FroggaBio) by electrophoresis on 1.5% agarose gel (Thermo Fisher Scientific) containing Red Safe (FroggaBio). Migration was performed using a sodium boric acid buffer (Brody and Kern, 2004) 45 min at 135 mV.

#### 4.4.4.4 Identification of *Streptococcus thermophilus*

Isolates belonging to the taxonomic group of *S. thermophilus/salivarius* were distinguished by PCR amplification of the *lacZ* gene. The technique was performed as described by Lick et al. (1996). The PCR conditions and primers are shown in Supplemental Tables C4 and C5 of the supplementary materials. The PCR products (968 bp) were analyzed as previously mentioned. *S. thermophilus* ATCC 19258 was used as a positive control and nuclease-free water as blank.

#### 4.4.5 Proteolytic enzyme test

The proteolytic activity of enterococci and streptococci isolates was assayed as described by Franciosi et al. (2009). Briefly, 2 µL of 16 h culture in M17 broth, after two subcultures, were dropped on Skim Milk Agar [10% skimmed milk powder (local supplier, QC, Canada) and 2% Agar (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, USA)]. The plates were incubated for 4 d at 37°C. Proteolytic activity (clear halo around the colony) were measured (Supplemental Figure C1). Halo diameter ranged from 16 to 23 mm corresponding to a strong proteolytic activity and halo diameter ranged from 9 to 16 mm corresponding to a low proteolytic activity. No halo corresponding to a negative proteolytic activity.

#### 4.4.6 Detection of vancomycin-resistant enterococci

Multiplex PCR assay for detection of seven types of VRE determinants (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*, *vanD/D4*, *vanM*, and *vanN*) were performed as described by Nomura et al. (2018). The PCR conditions and primers are shown in Supplemental Tables C6, C7, and C8. The PCR products were analyzed as previously mentioned. VanB-type *E. faecalis* ATCC 51299 was used as a positive control and *E. durans* DSM-20633 as negative control. For VRE determinants detected, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by microdilution method in triplicate following CLSI guidelines (Clinical Laboratory Standards Institute, 2012). The MIC is the highest dilution of antibiotic showing complete inhibition of the tested strain [approximate optical density equals optical density of the blank (M17 broth) measured at 565 nm].

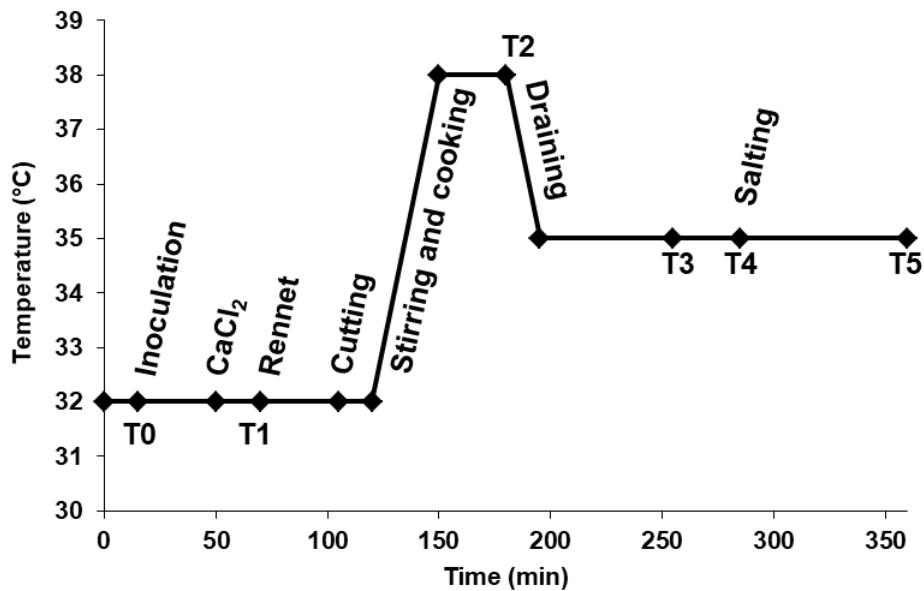
#### 4.4.7 Pearce activity test

The Pearce activity test (Cheddar manufature model) was performed as described by Desfossés-Foucault et al. (2014) to evaluate the effect of selected thermostable LAB associated with RMS-milk. Four strains were selected [two proteolytic *E. faecalis* (M155 and M236), one non-proteolytic *E. faecalis* (M390), and

one *S. thermophilus* (M388)]. These isolates of *E. faecalis* originated from milk of different farms using RMS. Microbial population and acidification curve during the production of cheese model were monitored. From the frozen culture, the reference Cheddar starter *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 and the selected thermoresistant LAB were subcultured twice and were grown in microfiltered containing 3.25% fat (local supplier, ON, CA). Briefly, during Pearce activity test, microfiltered milk was inoculated with the starter at  $10^7$  cfu/mL and with the thermoresistant LAB separately at  $10^6$  cfu/mL. Not inoculated milk was used as negative control. Steps and sampling times are shown in figure 4.1. At each of the latter, the pH was measured, and viable counts were performed. One milliliter of milk, or 1 g of curds, was taken and mixed for 5 min at 260 rpm in Stomacher 400 Circulator (Seward Laboratory Systems Inc., West Sussex, UK) with 9 mL of sodium citrate 2% (wt/vol). Then, the appropriate dilution was plated on M17 Agar for the starter, ST Agar for *S. thermophilus* (Ashraf and Shah, 2011), and MacConkey Agar without crystal violet for *E. faecalis* (Savard et al., 2011). The experiment was performed in triplicate.

#### 4.4.8 Statistical analysis

Comparisons were made between RMS-milk and straw-milk. Analyses were conducted both including and excluding the two farms where RMS was not composted. This did not influence summary measures of counts or STAMP analysis or the significance of differences between RMS-milk and straw-milk. Therefore, the results including all RMS samples are presented. Differences in viable counts of thermoduric and thermoresistant bacteria between bedding types were determined with JMP 13 Software (SAS Institute, Cary, NC), using non-parametric Wilcoxon test as the data did not exhibit a normal distribution. The relative abundance of taxonomic groups were compared with STAMP version 2.1.3 (Parks et al., 2014) following data transformation in the R environment (R Core Team, 2013) using Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) and Microbiome (Lahti and Shetty, 2017) packages. Significance was assessed with a two-tailed Welch's t-test, and the Storey's false discovery rate correction was applied on *P*-values. Chi-square test was conducted to determine if there was difference in presence or absence of proteolytic streptococci or enterococci between RMS-milk and straw-milk. Pearce activity test viable counts and pH values were compared by an analysis of variance (ANOVA) performed with JMP 13. The means were multi-compared using the Tukey's honestly significant difference test.

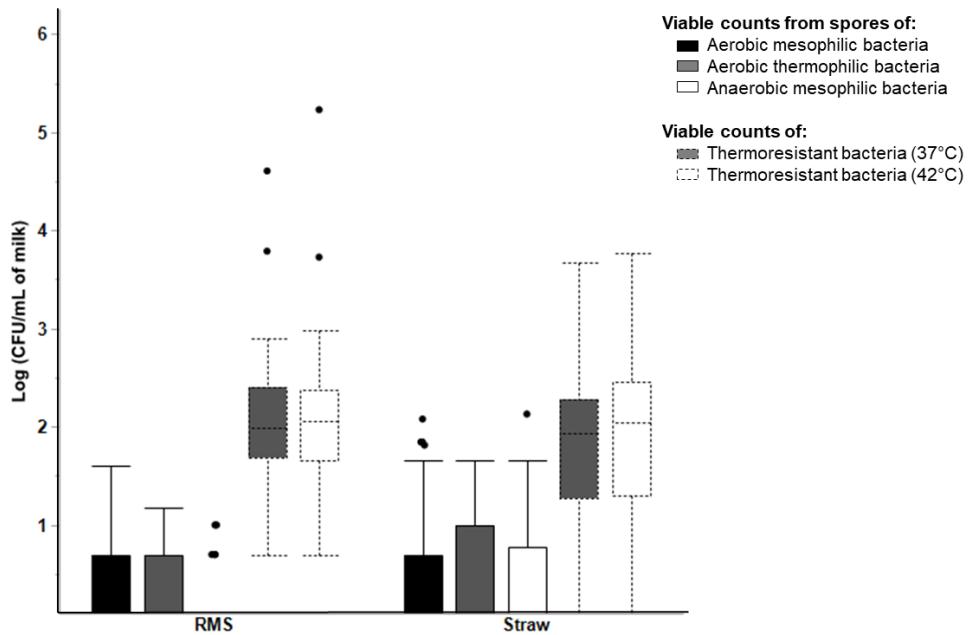


**Figure 4.1.** Temperature profile, steps, and sampling points (T0–T5) of the Pearce activity test

## 4.5 Results

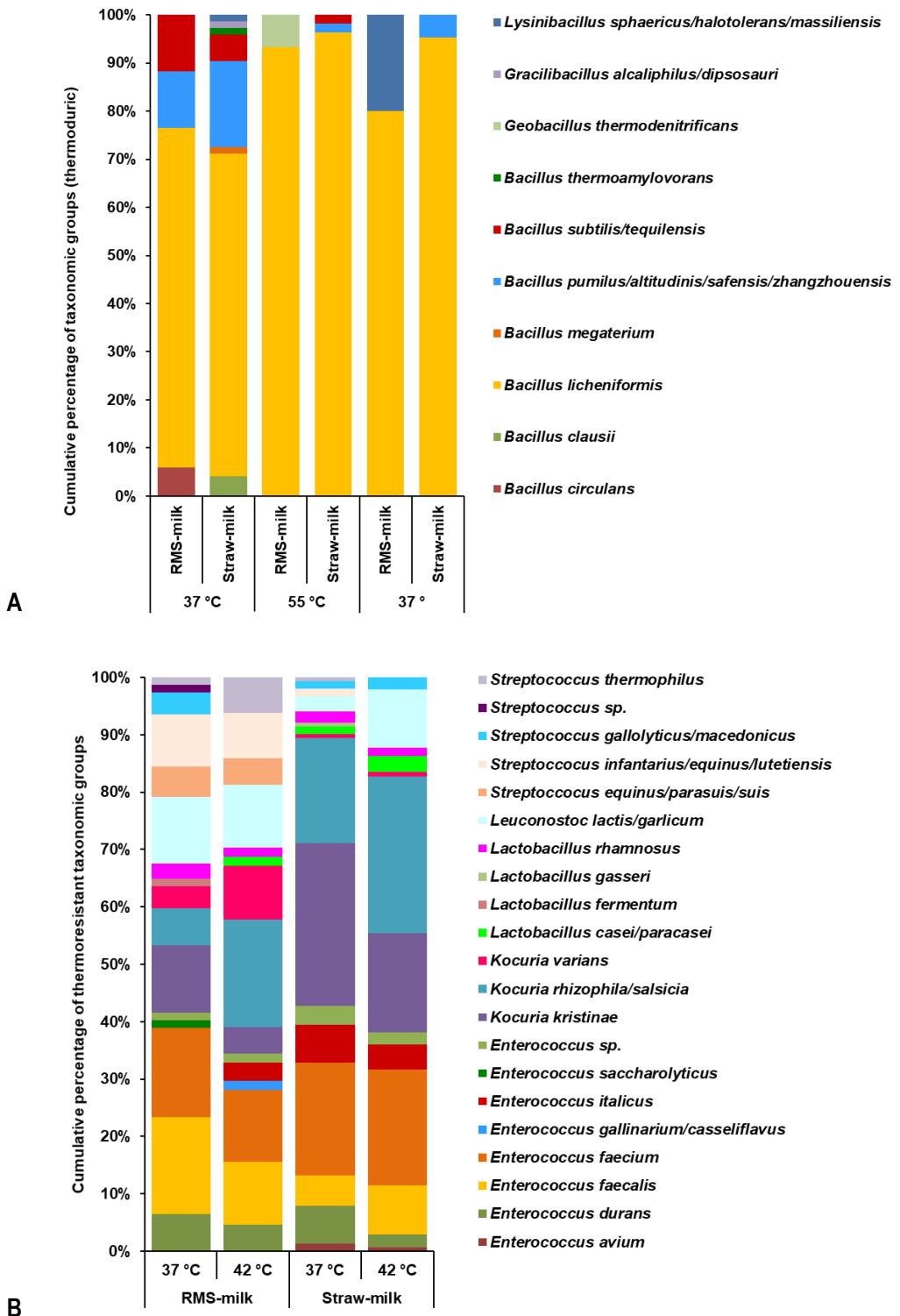
### 4.5.1 Effect of bedding type on thermoduric and thermoresistant bacteria viable counts in milk

First, no significant difference was observed in viable counts of aerobic mesophilic spore-forming bacteria between the two types of milk ( $Z$  value = -0.88;  $p$  = 0.38; Figure 4.2). Similar values for aerobic thermophilic spore-forming species were determined in milk and no significant difference was observed ( $Z$  value = -1.12;  $p$  = 0.26). Bedding types had an effect on anaerobic mesophilic viable counts from spores ( $Z$  value = -2.25;  $p$  = 0.02; Figure 4.2). The mean values obtained for milk samples from farms using straw bedding was higher than those using RMS; they were respectively 0.44 log and 0.17 log cfu/mL of fluid. As for thermoresistant bacteria, viable counts were not affected by the bedding type during an incubation at 37°C, or at 42°C (37°C:  $Z$  value = 0.97;  $p$  = 0.33; 42°C:  $Z$  value = 0.34;  $p$  = 0.74; Figure 4.2).

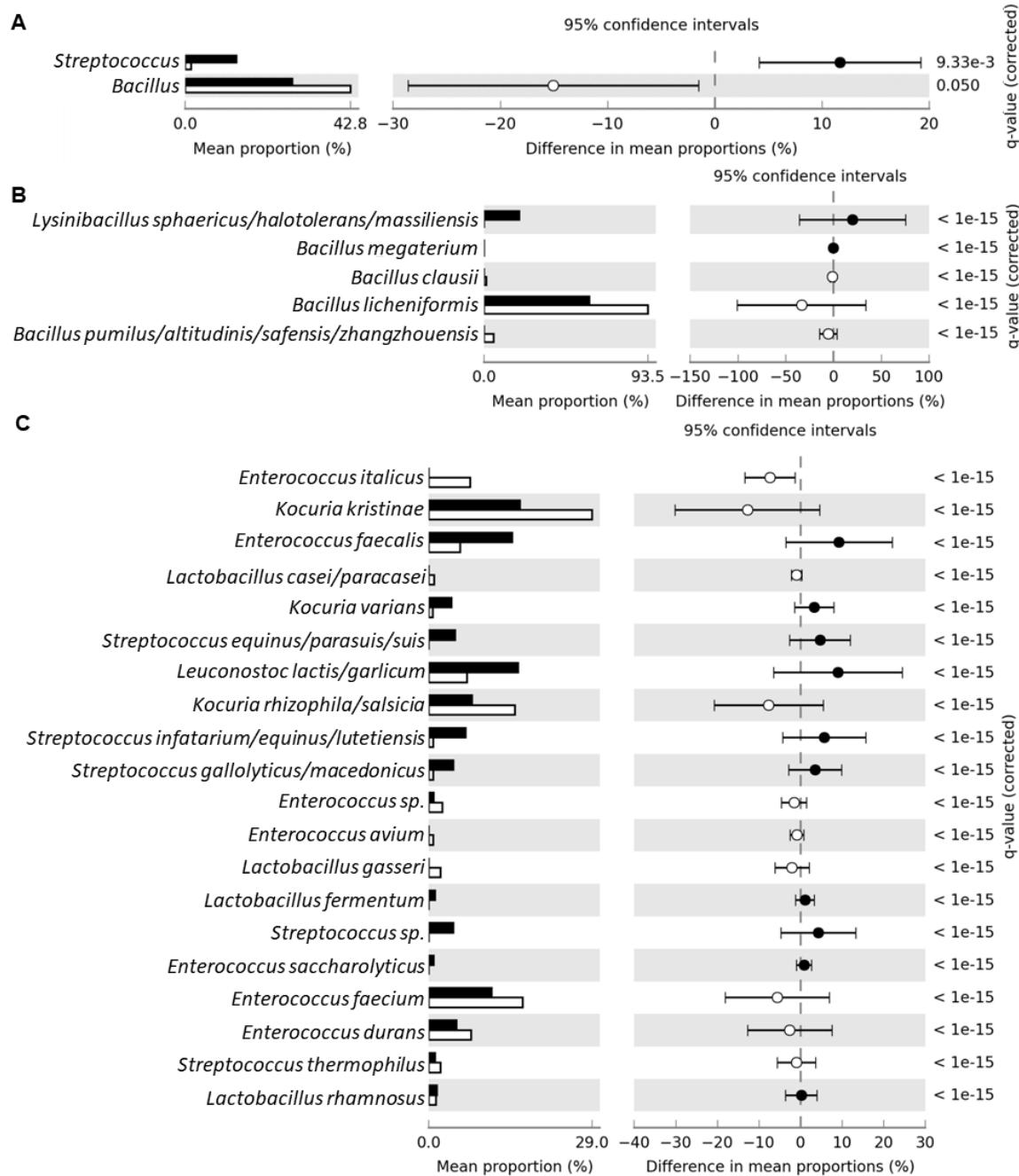


**Figure 4.2.** Box plot created from viable counts of thermoduric (spore of aerobic mesophilic, aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic bacteria) and thermoresistant bacteria in bulk tank milk from farms using recycled manure solids (RMS) or straw bedding. Thermoresistant were incubated at two different temperatures, 37°C and 42°C. The lines represent the median and the ends of the box represent the 1st and 3rd quartiles. The whiskers represent 1st quartile – 1.5 × (interquartile range) and 3rd quartile + 1.5 × (interquartile range), and the dots represent the outliers.

A total of 90 mesophilic and 69 thermophilic aerobic spore-forming bacteria were isolated from milk samples. Ten different taxonomic groups of *Bacillaceae* were identified, belonging mostly to the genus *Bacillus* (Figure 4.3A). The other genera were *Lysinibacillus*, *Gracilibacillus*, and *Geobacillus*. *Bacillus licheniformis* was the dominant species, accounting for 68% of mesophilic and 93% of thermophilic bacteria. The other ones identified that belong to the genus *Bacillus* were *B. circulans*, *B. clausii*, *B. megaterium*, *B. pumilus/altitudinis/safensis/zhangzhouensis*, *B. subtilis/tequilensis*, and *B. thermoamylovorans*. Statistical analyses performed with STAMP indicated that *Bacillus* spp. were significantly more abundant in straw-milk samples (Figure 4.4A), but this difference was explained by anaerobic spore formers. As previously mentioned, milk samples from farms using RMS had a smaller number of anaerobic spore-forming bacteria than those using straw bedding. Five isolates were found in RMS-milk samples against 43 in straw-milk samples. *B. licheniformis* was the most abundant taxonomic group in anaerobic spore formers. Furthermore, it was significantly more abundant in straw-milk samples (Figure 4.4B). On the other hand, RMS-milk samples contained more *Lysinibacillus sphaericus/halotolerans/massiliensis*.



**Figure 4.3.** Cumulative percentage distinguishing taxonomic groups from farm using recycled manure solids (RMS) and straw as bedding of (A) spore-forming bacteria isolated from milk heated at 80°C, for 10 min, and (B) bacteria isolated on M17 Agar at 37°C and 42°C from milk heated at 63°C, for 10 min.



**Figure 4.4** Statistical analysis of thermoduric and thermoresistant taxonomic groups isolated from milk samples from farms using recycled manure solids (in black) and straw (in white) as bedding using the STAMP software. The Storey's false discovery rate correction was applied when means were multi-compared. (A) Genus comparison for all growth conditions, (B) Species comparison for anaerobic growth, and (C) Species comparison for M17 at 37°C. The error bars represent calculated confidence intervals

In total, 432 isolates of thermoresistant bacteria were collected on M17 Agar, 141 of these from RMS-milk samples (77 isolates at 37°C and 64 at 42°C) and the 291 remaining from milk samples of straw bedding (152 isolates at 37°C and 139 at 42°C). LAB identified belonged to four genera [i.e. *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Streptococcus* (Figure 4.3B)]. The genus *Kocuria* is not part of LAB but of the *Micrococcaceae* family; members were also present. As expected, more isolates of *S. thermophilus* were recovered when M17 Agar preparations were incubated at 42°C. Unlike thermoduric bacteria, the profiles of thermoresistant ones from RMS- and straw-milk samples were different. According to STAMP analysis, among all the isolates recovered at both 37 and 42°C, only the relative abundance of the genus *Streptococcus* varied significantly, with nearly seven times higher values in RMS-milk samples (20%) compared to straw-milk samples (3%; Figures 4.3B and 4.4A). At the species level, no significant difference in isolates was observed when comparing the two groups of farms. However, when comparing isolates from the two groups of farms at each incubation temperature separately, the STAMP analysis was showing that the relative abundance varied significantly only at 37°C. *Kocuria kristinae* and *Kocuria rhizophila/salsicia* were twice as abundant as in straw-milk samples than in RMS-milk samples (Figure 4.4C). The abundance of *Enterococcus* spp. was comparable in both types of bedding (39%; Figure 4.3B). Nevertheless, in enterococci, *E. faecalis* was significantly more present in RMS-milk samples than in straw-milk samples. Unlike *E. faecalis*, *E. faecium* significantly was more abundant in the latter (16% in RMS-milk samples vs. 20% in straw-milk samples; Figures 4.3B and 4.4C).

#### 4.5.2 Proteolytic activity of streptococci and enterococci

Out of 208 enterococci and streptococci tested, only 21 isolates identified as *E. faecalis* had positive proteolytic activities (Table 4.2). The prevalence of farms contained proteolytic *E. faecalis* in milk samples was 7% for farms using straw bedding (5/58) compared to 15% for farm using RMS (4/26). However, this difference was not significant ( $P = 0.37$ ).

#### 4.5.3 Vancomycin-resistance of enterococci

Out of 171 thermoresistant enterococcal isolates, one strain, *E. gallinarium/casseliflavus* M530, had vancomycin-resistance associated genes. This strain was isolated from RMS-milk. The M530 strain had two genotypes, *vanN* (941 bp) and *vanC1* (836 bp). The *vanB* gene of *E. faecalis* ATCC 51299 was also detected (640 bp). In the present study, the MIC calculated of the vancomycin-resistant *E. faecalis* ATCC 51299 and vancomycin sensitive *E. durans* DSM-20633 was respectively 62.5 µg/mL and 1.95 µg/mL. Vancomycin resistance of *E. gallinarium/casseliflavus* M530 was confirmed with a MIC of 15.6 µg/mL.

**Table 4.2.** Thermoresistant *Enterococcus faecalis* with positive proteolytic activity isolated from bulk tank milk collected from farms using straw or recycled manure solids (RMS) as bedding

	Isolate code	Farm code	Proteolytic activity <sup>1</sup>
Straw	M097	1243	++
	M285		+
	M284		++
	M282	1261	++
	M283		++
	M287		++
	M436		+
	M437	1272	+
	M450		++
	M447		++
RMS	M441	1273	++
	M680	1288	++
	M155	1104	++
	M242		+
	M239		+
	M240	1109	+
	M237		+
	M234		++
	M236		++
	M500	1123	+
	M689	1127	++

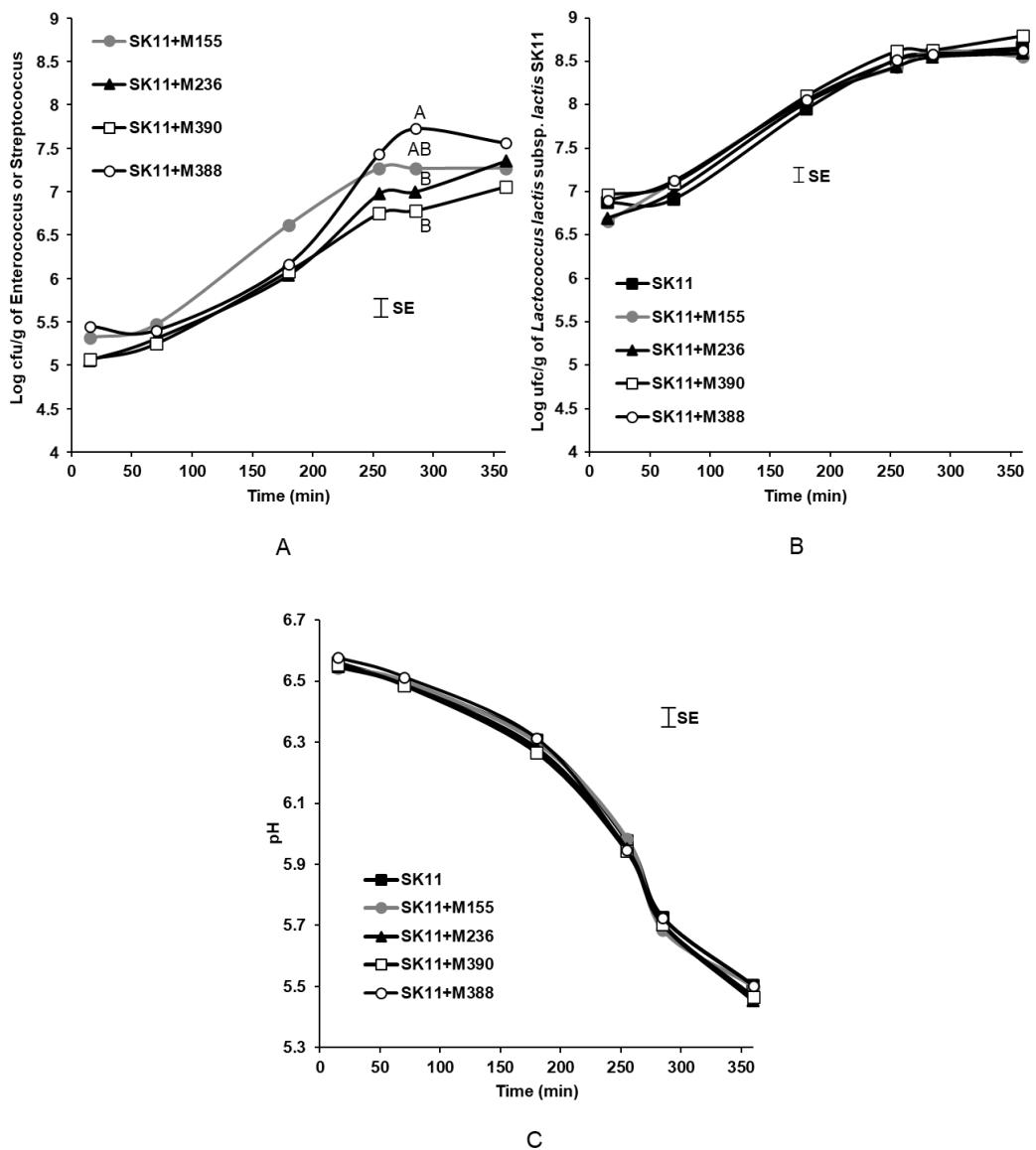
<sup>1</sup>++: Halo diameter ranged from 16 to 23 mm;

+: Halo diameter ranged from 9 to 16 mm

#### 4.5.4 Effect of thermoresistant bacteria from RMS in Cheddar manufacture

Two proteolytic *E. faecalis* (M155 and M236), one non-proteolytic *E. faecalis* (M390), and one *S. thermophilus* (M388) isolates from RMS-milk samples were selected. The four thermoresistant strains grew well during the Pearce activity test (Figure 4.5A). The viable counts of *E. faecalis* and *S. thermophilus* strains were significantly different at the salting step at 285 min (sampling point T4). At this sampling point, *S. thermophilus* M388 was assessed at a higher concentration than *E. faecalis* M236 and M390 ( $F$  value = 7.2031;  $p$  = 0.0116). After the salting step, *S. thermophilus* M388 was less cultivable and *E. faecalis* M155 stayed stable. However, for the other strains M236 and M390, viable counts increased between sampling points T4 and T5. Therefore, at the 360-min time point, the four thermoresistant strains had the same concentration. Even if these grew during the Cheddar manufacture, they did not inhibit nor improve significantly the growth of the starter *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 (Figure 4.5B). As for the starter viable counts, the

presence of the thermoresistant LAB selected did not impact the acidification curve despite their growth ( $P > 0.05$ ; Figure 4.5C). Milk was acidified by the starter *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11, a process during which the pH shifted from 6.56 to 5.49 after 6 h of manufacture.



**Figure 4.5.** Pearce activity test viable counts of (A) thermoresistant *Enterococcus faecalis* M155, M236, and M390 or *Streptococcus thermophilus* M388 and (B) starter *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and (C) Pearce activity test acidification curves with the starter *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 and inoculation of SK11 mixed cultures. The error bars represent the standard error (SE). Means with distinct capital letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 4.6 Discussion

The thermoduric and thermoresistant bacteria concentrations were no higher in raw milk originating from farms using RMS compared to samples from those using straw bedding (Figure 4.2). This result corroborates that of Bradley et al. (2018) who showed that the bedding type (not composted RMS, sand, and sawdust) did not affect the total bacterial count in bulk tank milk, even though counts in the bedding material itself were higher when RMS was used, compared with sand or sawdust. Rowbotham and Ruegg (2015) found similar results. In their study comparing the following bedding materials: inorganic, organic nonmanure, and manure-based, there was no association between total bacterial count in bulk tank milk and bedding type. The composting of bedding has been associated with an increase of thermophilic aerobic spore-forming bacteria in milk (Driehuis et al. 2014). However, in our study almost all farms used composting RMS, but no significant differences were observed compared with straw bedding. Moreover, the inclusion or exclusion of the two farms that did not compost RMS did not affect the findings. This would imply that most of the bacterial population in milk originated from the mammary gland, rather than from contamination during harvesting. Bradley et al. (2018) demonstrated a difference in thermophilic spore counts between three bedding materials (RMS, sand and sawdust) but no influence of bedding type on the thermophilic spore counts in the milk produced. The thermophilic viable count from spores was higher (~2 log cfu/mL) than in the present study. This could be explained by the difference in climate between United Kingdom and Canada. Also, in the present study, samples were collected only in spring in comparison to December to March. Our results are more similar to those of Buehner et al. (2014). The spores count in raw milk collected in winter in the Midwest of the United States were respectively 0.69 and 0.39 log cfu/mL for mesophilic spores and thermoduric spores. The authors showed an increase of spores count during summer. Other factors, for example use of silage could influence the concentration of spore-forming bacteria in milk (Driehuis, 2013; Buehner et al., 2014), but no information about feeding type were collected in the present study.

The identification of isolates in the current study has shown that aerobic spore-forming bacteria are similar in milk samples regardless of the bedding type (Figure 4.3A). *Bacillus licheniformis* appeared to be adapted to different culture conditions, as it was the most abundant species among the aerobic (thermophilic and mesophilic) and anaerobic spore formers. Our results are in agreement with the study of Coorevits et al. (2008) who demonstrated the dominance of *B. licheniformis* in milk from organic and conventional dairy farms. In the present study, anaerobic *B. licheniformis* was more abundant in milk from farm using straw bedding. This species has already been reported to grow in anaerobic conditions (Clements et al., 2002). *B. licheniformis* anaerobic respiration using nitric oxide reductase is possible (Rey et al., 2004). This type of enzyme is associated with denitrification (Hendriks et al., 2000) and could explain the presence of anaerobic *B. licheniformis* in soil, and transfer to straw bedding. Another difference in anaerobic spore formers was the presence of *Lysinibacillus*

*sphaericus*/*halotolerans*/*massiliensis* only in RMS-milk samples. Members of the genus *Lysinibacillus* have previously been isolated in bulk tank milk but was not linked to particular management practices (Miller et al., 2015). Moreover, *Lysinibacillus* spp. are common in dairy cow fecal microbiota (Mao et al., 2012) and could be associated with RMS. However, this is to be taken lightly considering the limited number of isolates, especially since they did not show strong proteolytic activities in milk, neither cytotoxicity nor toxigenic activities (De Jonghe et al., 2010). Anaerobic spore-forming *C. butyricum* was a major concern regarding the use of RMS for cheese defects (Driehuis et al., 2013). Fortunately, we did not detect cultivable *C. tyrobutyricum* in RMS- nor straw-milk samples. *Bacillus cereus*, an important food pathogen, was not found in bulk tank milk. Based on our results, using RMS does not seem to affect the occurrence of bacterial spores in milk.

The identification of bacteria isolated on M17 Agar demonstrated that this medium was not specific to LAB because numerous strains of *Kocuria* spp. were collected (Figure 4.3B). Some studies indicated that their growth can be supported on M17 medium (Renye et al., 2011; Yunita and Dodd, 2018). Therefore, we obtained thermoresistant bacteria profiles rather than thermoresistant LAB profiles. These were affected by milk origin. *Kocuria* spp. were more abundant in straw-milk samples. This genus is common in the dairy environment (Quigley et al., 2013) and isolates have already been reported in pasteurized milk samples (Coorevits et al., 2008). *Kocuria* spp. were found in farm air and hay (Lis et al., 2008; Vacheyrou et al., 2011). Furthermore, *K. kristinae* has been isolated from biofilms covering wooden vats collected in a farm (Licitra et al., 2007). However, it is not clear if the higher abundance of this genus, more specifically *K. rhizophila/salsicia* and *K. kristinae*, is related directly to straw bedding.

The use of RMS was associated with a higher abundance of thermoresistant *Streptococcus* spp. and *E. faecalis* in milk (Figures 4.3B and 4.4). Zdanowicz et al. (2004) revealed a positive correlation between bacterial populations, including *Streptococcus* spp., in the sand bedding and on the teat skin. Indeed, some studies indicated a high quantity of *Streptococcus* spp. in RMS [e.g., 9 log (Sorter et al., 2014) and 6 log cfu/g of DM (Fournel et al., 2019b)]. Fournel et al. (2019b) demonstrated that the solid-liquid separation methods and composting time did not impact their presence in the bedding. Also, *Streptococcus* spp. can grow in the RMS obtained by composting, from 4.8 log to 8.7 log cfu/g of DM (Cole and Hogan, 2016). Therefore, higher levels in RMS-milk samples could be linked to their presence in the bedding. This could be an issue since environmental streptococci, other than *S. uberis* and *S. dysgalactiae*, like *S. galloyticus* and *S. lutetiensis*, can cause mastitis in dairy cows (Cameron et al., 2016). This infection increases the number of somatic cells in raw milk. A high count of those reduces the product yield of Cheddar cheese (Auldist et al., 1996). However, it is not clear in the literature that RMS increase the prevalence of clinical mastitis (Leach et al., 2015). Future investigations will be needed on this point. Despite the fact that in our study *S. thermophilus* M388 did not affect the Cheddar manufacture (Figure 4.5), the presence of this species in RMS-milk samples is also worrying for cheesemakers.

Indeed, some strains can form biofilms on stainless steel. These can cause many problems in cheese manufacturing plants such as undesirable contamination of dairy products and uncontrolled milk acidification during this food production (Bassi et al., 2017).

The equivalent abundance of enterococci in the two types of milk is not surprising as they are present not only in cow feces, but also in soil and plants (Gelsomino et al., 2002). In comparison to environmental streptococci having a continued susceptibility to  $\beta$ -lactam antimicrobials (Cameron et al. 2016), the higher abundance of *E. faecalis* in RMS-milk sample could be of concern, given that this species has been identified as resistant to the glycopeptide antimicrobial vancomycin (O'Driscoll and Crank, 2015). Moreover, this species has a high potential for pathogenicity. However, we have not detected any vancomycin-resistant determinants belonging to this species. The low VRE strain, *E. gallinarium/casseliflavus* M530 collected in a milk sample from a farm using RMS had the *vanC* and *vanN* genotype. The chromosomal *vanC* gene is intrinsic to *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* species and corresponds to a low resistance to vancomycin (MIC between 2-32  $\mu$ g/mL). Like *vanC*, the presence of *vanN* gene produces a low vancomycin-resistant phenotype (MIC of 15  $\mu$ g/mL). The presence of this gene can be problematic as it is in plasmid (O'driscoll and Crank, 2015). VanN-type *E. faecium* strains were reported in clinical settings in Canada and in chicken meat in Japan (Nomura et al. 2018). However, we cannot link the *E. gallinarium/casseliflavus* M530 strain directly to the use of RMS. The multiplex PCR test used in this study, could be used to detect VRE in RMS directly in future studies.

*Enterococcus faecalis* isolated from RMS-milk did not impact the Cheddar manufacture as the strains tested did not modify the acidification curve. Nevertheless, the number of those bacteria increased during the six hours of cheese production. This suggests that their presence would be elevated at the beginning of the ripening, and as such, given the proteolytic activity of species like *E. faecalis*, noxious effects could occur during this step. The addition of salt in the curd helps to control microbial metabolism, such as proteolysis (Fox et al., 2017e). However, two *E. faecalis* strains (M236 and M390) isolated from RMS-milk samples have shown a NaCl tolerance. Uncontrolled proteolysis of casein can have a major effect on the Cheddar texture (Lawrence et al., 2004). Also, the breakdown of proteins followed by the catabolism of amino acids can produce off-flavor volatile compounds (Singh et al., 2003; Lawrence et al., 2004). As bulk tank samples from farms using RMS contained more thermostable *Streptococcus* spp. and *E. faecalis*, the milk could be prioritized for fresh cheese (no ripening step). Otherwise, it could be microfiltered before cheesemaking. Moreover, the RMS production is not standardized in Canada. Further studies on RMS production could help to limit spoilage and pathogen bacteria such as enterococci and streptococci (Fournel et al., 2019a; b).

## **4.7 Conclusions**

Our study investigated under farm conditions the effect of RMS bedding used in dairy farms on thermoduric and thermoresistant milk microbiota in comparison to conventional straw bedding. Aerobic spore formers and thermoresistant bacteria concentrations in milk were not higher in milk samples from farms using RMS. However, RMS bedding introduces an increased risk of having thermoresistant streptococci and enterococci in milk. Potentially, *E. faecalis* strains with proteolytic activity and NaCl tolerance could be noxious for Cheddar cheese ripening. Therefore, it remains important to assess the effect of new farm management practices on milk quality. This knowledge could help cheesemakers to select milk (e.g., use of milk from RMS farms for fresh cheese with no ripening step). To assure the milk producers and the cheesemakers that the RMS bedding is safe, future work using metagenomics to also target viable but non-culturable bacteria will have to be done. Moreover, because the use of RMS is relatively new, the different production methods will have to be compared in combination with milk quality.

## **4.8 Acknowledgments**

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Novalait, Agriculture and Agri-Food Canada, and the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) for their financial contribution. They also give special thanks to the Op<sup>+</sup>Lait research group which allowed the creation and realization of this project. The authors also thank all members of Dr. Dufour's and Dr. Roy's teams for their technical assistance and scientific advice, particularly Alexandre Jules Kennang Ouamba in regard to the statistical analysis and Caroline Forest for technical assistance during the collection of samples. The authors sincerely thank Dominique Fournier ([www.serviceslinguistiquesdf.com](http://www.serviceslinguistiquesdf.com)) for editing and improving the text of the manuscript.

## Chapitre 5 – Discussion générale

Dans cette thèse, l'impact des bactéries lactiques (LAB) thermorésistantes associées à l'utilisation de l'ensilage et de la litière de fumier recyclé (LFR) sur la qualité microbiologique du lait cru et sur la production du fromage cheddar a été évaluée grâce à la réalisation de trois objectifs. Premièrement, l'évaluation de l'impact de différents fourrages sur les profils de LAB du lait cru et leur caractérisation par une approche polyphasique ont été réalisées et rapportées dans le chapitre 2. Il a été montré qu'il y avait des variations dans le profil des LAB en fonction du type de fourrage (foin, ensilage de graminées ou de légumineuse et ensilage de maïs), ainsi qu'en fonction de l'inoculation des ensilages avec *Lactobacillus buchneri*. Comme attendu, la quantité de LAB dans le foin était plus faible que dans les ensilages considérant qu'il ne s'agit pas d'un fourrage fermenté. Les profils de LAB des ensilages, qu'ils soient inoculés ou non, ont démontré une grande abondance relative de *Lactobacillus* et plus précisément de *L. buchneri*. Cette espèce était rarement présente dans le foin. Il a été montré que les ensilages de graminées ou de légumineuses inoculés avaient 35% plus de lactobacilles en abondance relative. Une abondance relative significativement plus faible de *Pediococcus* et de *Weissella* a aussi été observée. En revanche, bien que les profils en LAB des fourrages étaient différents, la quantité et le profil des LAB retrouvées dans le lait étaient très peu affectés par les types de fourrage utilisés. Plusieurs espèces de LAB étaient présentes à la fois dans les fourrages et dans les laits. Toutefois, la caractérisation des souches par une approche polyphasique (identification par le séquençage partiel du gène de l'ARN 16S, typage par amplification aléatoire de l'ADN polymorphe et caractérisation de l'activité antibactérienne) a démontré que 6 % des souches collectées dans le lait pouvaient provenir des fourrages. De plus, *L. buchneri* était très peu présente dans les laits que les vaches aient été nourries à l'ensilage inoculé ou non avec cette bactérie.

Dans un second temps, le comportement lors d'une production modèle de cheddar de deux souches de LAB thermorésistantes isolées du lait provenant de vaches nourries à l'ensilage, ainsi que leurs effets sur les qualités organoleptiques ont été déterminés lors des travaux présentés au chapitre 3. *Lactobacillus plantarum* RKG 2-212 et *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 ont démontré leur résistance à la chaleur pouvant être attribuable aux gènes codant pour des protéines de résistance au choc thermique. Il est donc plausible de retrouver ces types de souches dans une production de cheddar. Aucune des souches n'a démontré un impact clair lors de la production modèle de cheddar frais en coculture avec le ferment *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11. En revanche, lors de l'affinage modèle *L. plantarum* RKG 2-212 a entraîné une diminution du pH de la pâte probablement lié à sa croissance. Cette diminution de pH pourrait être vraisemblablement causée des défauts de texture. La viabilité de *L. delbrueckii* RKG R10 a subi une très légère diminution et a peu interféré avec le déroulement de l'affinage. Les deux souches ont affecté les profils des composés volatils produits lors de l'affinage, mais les effets ont été plus marqués avec *L. plantarum* RKG 2-212. Certains de ces composés comme l'acide acétique et le 2-methylbutanal peuvent être liés à des défauts de flaveurs. Donc, bien que

contribuant faiblement à la contamination en LAB thermorésistantes du lait cru, l'ensilage peut apporter des souches nuisibles à la fabrication fromagère.

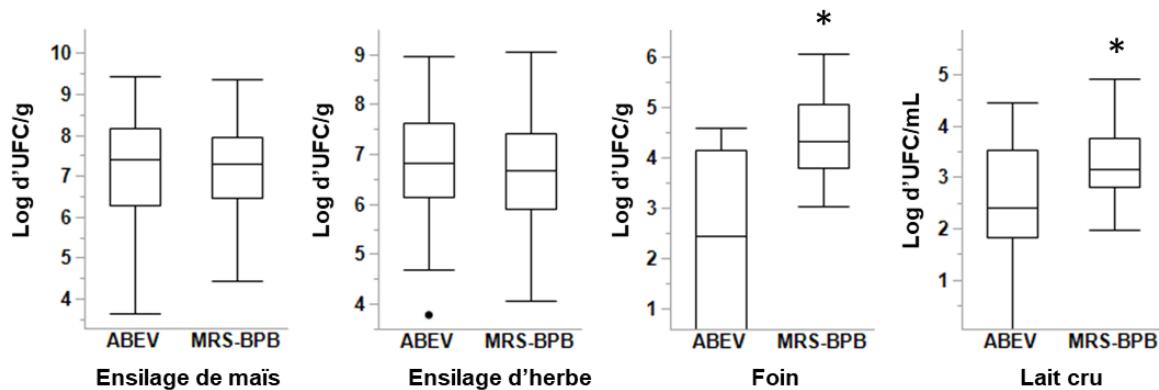
Finalement, l'impact de l'utilisation de la LFR sur la présence de LAB thermorésistantes dans le lait a été étudié au cours des travaux faisant l'objet du chapitre 4. Dans ce même chapitre, le comportement de souches de LAB thermorésistantes associées à la LFR lors de la production modèle de cheddar a été étudié. Dans cette étude, les laits provenant de fermes utilisant la LFR contenaient une plus grande proportion d'*Enterococcus faecalis* et de *Streptococcus* thermorésistants. De surcroît, plus de la moitié des souches d'*E. faecalis* étaient protéolytiques. Cependant, les souches de cette espèce, dont deux souches protéolytiques en coculture avec *Lcc. lactis* ssp. *cremoris* SK11 n'ont pas influencé la production modèle de cheddar frais. Durant celle-ci, ces souches ont démontré une forte croissance de leur population. Cela indique qu'elles pourraient se retrouver à l'étape de l'affinage en grand nombre. Cela pourrait donc être problématique pour le développement des saveurs et de la texture du cheddar et d'autant plus pour les souches protéolytiques.

Les résultats présentés dans ces trois chapitres, ainsi que les techniques utilisées, seront discutés en détail ci-dessous. Ils seront aussi mis en relation avec des données supplémentaires.

## 5.1 Dénombrement, identification et typage

Les comptes viables sont utiles pour évaluer l'abondance d'un groupe donné de microorganismes. Par contre, les travaux présentés dans cette thèse ont révélé que l'utilisation seule des comptes viables n'est pas suffisante. Premièrement, les milieux pour utilisés pour la croissance des LAB, dont le MRS et le M17, ont démontré un manque de spécificité. En effet, les concentrations de LAB obtenues par comptes viables avec les milieux ABEV et MRS-BPB ont été comparées pour différentes matrices (figure 5.1). Ces concentrations étaient similaires pour deux types d'ensilages (herbe et maïs). Cependant, dans le cas du foin et du lait cru, le compte viable était significativement supérieur pour le milieu MRS-BPB comparativement au milieu ABEV (foin :  $p < 0.01$ ; lait :  $p < 0.01$ ). L'identification des isolats rapportée au chapitre 2 a démontré que le MRS-BPB pouvait être très peu spécifique aux LAB (tableau A6). Pour le foin et le lait, respectivement 36 et 22% des isolats collectés sur MRS-BPB n'appartenaient pas à l'ordre des *Lactobacillales*. Ces isolats ont été identifiés comme *Acetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., cyanobactérie, entérobactérie, *Escherichia coli*, *Hafnia* sp., *Klebsiella* sp., *Kocuria* sp., *Raoultella* sp. et *Staphylococcus* sp. Quant au milieu M17 qui est utilisé pour les streptocoques et les entérococques lactiques, il est lui aussi non spécifique, car comme démontré au chapitre 4, il permet la croissance des bactéries du genre *Kocuria* retrouvées dans le lait. Donc, en fonction de la matrice et surtout en fonction de la proportion de LAB retrouvée dans celle-ci, la concentration de LAB estimée par comptes viables peut être biaisée. Il est d'ailleurs reconnu que le foin et le lait cru contiennent plusieurs autres groupes bactériens (Lin et al., 1992b; Rasolofo et al., 2010). La plus grande spécificité du milieu ABEV est

attribuable à la vancomycine (Henri-Dubernet et al., 2008). En revanche, certaines espèces de LAB peuvent se montrer sensibles face à cet antibiotique. Il est donc préférable d'évaluer en fonction des matrices échantillonnées s'il est pertinent de l'ajouter ou non. L'avantage de la vancomycine est qu'elle peut être ajoutée facilement à tous milieux de culture.



**Figure 5.1.** Compte viable de bactéries lactiques exprimé en Log d'unité formatrice de colonie par g ou mL sur milieu ABEV (arginine, mauve de bromocrésol, extrait de bœuf et vancomycine) et MRS-BPB (MRS avec bleu de bromophénol). Les moyennes significativement différentes sont identifiées avec un astérisque ( $P < 0.01$ ).

Bien qu'il soit possible d'améliorer la spécificité d'un milieu pour LAB avec l'ajout d'un antibiotique, il est préférable de ne pas faire l'observation de l'effet d'un traitement uniquement avec des dénombremens bactériens. Effectivement, les résultats du chapitre 2 ont démontré que même si les différents types d'ensilages avaient une quantité de LAB similaires, les groupes taxonomiques eux différaient. Dans le même sens, les résultats présentés au chapitre 4 ont bien montré que l'utilisation de la LFR avait un impact sur la qualité microbiologique du lait cru, malgré le fait que les échantillons de lait associés à l'utilisation de la LFR contenaient la même quantité de LAB thermorésistantes que ceux associés à la litière de paille. L'impact de la LFR a été observé seulement par l'identification des bactéries isolées.

Il est vrai que l'utilisation de techniques cultures-dépendantes décrites dans les chapitres 2 et 4 peut être énergivore en temps et en argent (Desfossés-Foucault et al., 2012; Di Bella et al., 2013; Ercolini, 2013). Cependant, cela représente plusieurs avantages comparativement aux techniques cultures-indépendantes comme le PMA-qPCR, la métataxonomique et la métagénomique. En effet, il arrive que ces techniques soient plus ardues à réaliser lorsque la concentration en bactéries est faible. Une quantification par PMA-qPCR des principales espèces de LAB après pasteurisation du lait a été tentée, afin d'observer si les rations à base d'ensilage augmentent la présente de LAB thermorésistantes dans le lait. La quantité de ces dernières était sous la limite de détection. Donc, aucune conclusion n'a pu être tirée à partir de cette approche. En revanche,

en mettant les laits pasteurisés sur gélose, il a été possible de faire des dénombrements et d'isoler des LAB thermorésistantes. La limite de quantification par qPCR est variable en fonction de la matrice, de la cible et des amorces. Dans le lait, des limites de détection allant de  $10^2$  à  $10^4$  cellules/g ont été observées (Postollec et al., 2011). L'extraction de l'ADN total d'un échantillon rend son utilisation limitée. Donc, la création d'une banque de souche permet de les remettre en culture pour récupérer à nouveau de l'ADN lorsque nécessaire. Par exemple, l'identification des souches par le gène de l'ARN 16S demeure une méthode efficace d'autant plus qu'elle permet l'utilisation d'amorces universelles. Par contre, il peut être difficile de différencier certaines espèces de LAB en se basant sur ce gène, car elles sont proches phylogénétiquement (Salvetti et al., 2012). Comme utilisé lors des travaux présentés aux chapitres 2 et 4, des PCR en multiplex peuvent raffiner l'identification à l'espèce (Torriani et al., 2001; Layton et al., 2010). La caractérisation de souches résistantes aux antibiotiques peut aussi être réalisée grâce à une analyse PCR et nécessite donc de l'ADN (Nomura et al., 2018). Le typage par RAPD des souches s'est aussi avéré utile dans le cadre des travaux présentés au chapitre 2. En effet, même si des espèces identiques ont été identifiées dans l'ensilage et le lait cru, il s'agissait rarement de la même souche. Bref, la création d'une banque de souche peut permettre une plus grande caractérisation des bactéries présentes *a posteriori*. Une banque de souches permet aussi de tester les souches individuellement, afin d'avoir un aperçu de leur impact. C'est précisément ce qui a été fait dans le chapitre 3 et 4, lorsque l'effet de souches thermorésistantes associées à l'ensilage et la LFR dans une production fromagère modèle a été testé. Comme le mentionne Weber et al. (2014), l'idéal pour dresser un portrait des espèces bactériennes présentes dans le lait est de combiner les techniques cultures-dépendantes et indépendantes. Avec la démocratisation des techniques de séquençage à haut débit, le séquençage du génome complet des isolats comme utilisé dans le cadre des travaux présentés au chapitre 3 semble une bonne avenue qui devrait gagner en popularité. En effet, il est possible de caractériser une banque de souche plus rapidement et d'effectuer des typages basés sur les séquences d'ADN comme les schémas MSLT (Boers et al., 2012; Nastasijevic et al., 2017). Il demeure donc possible de comparer ces typages à ceux qui auraient été faits antérieurement avec d'autres souches.

## 5.2 Inoculant pour l'ensilage

À la lumière de nos résultats, l'inoculation avec *L. buchneri* ne semble pas problématique, car que l'ensilage soit inoculé ou pas, il s'agit quand même d'une espèce dominante, lorsque l'ensilage est stabilisé. De surcroît, cette espèce a rarement été retrouvée dans le lait. L'inoculation avec d'autres espèces telles que *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Enterococcus faecium* et *Lactobacillus plantarum* demeurent toutefois plus discutable. Ces espèces sont plus susceptibles de se retrouver dans le lait comme démontrer dans le chapitre 2. La souche thermorésistante *L. plantarum* RKG 2-212, originaire de l'ensilage de maïs, a d'ailleurs démontré son potentiel à survivre à une production de cheddar et à moduler l'affinage de celui-ci, pouvant mener à des défauts de texture et de flaveur (chapitre 3).

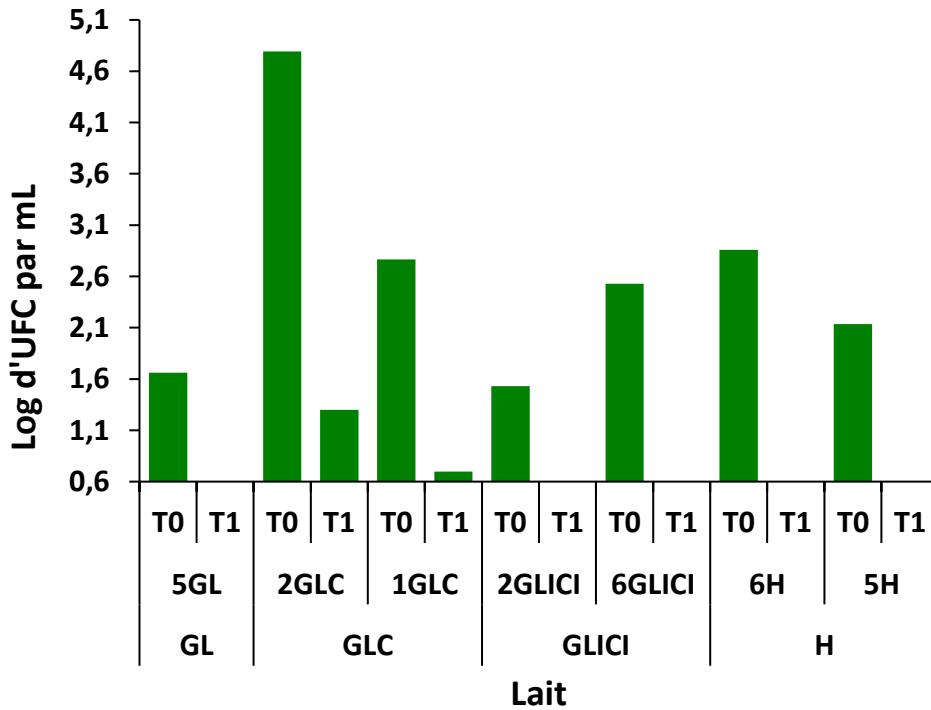
Un échantillonnage réalisé à l'automne 2016 de sept fermes avait pour objectif d'isoler des LAB thermorésistantes. Il s'agit de fermes précédemment échantillonnées lors des travaux décrits au chapitre 2, soit une ferme utilisant l'ensilage de graminées ou de légumineuses non inoculé (5GL), deux fermes utilisant l'ensilage de graminées ou de légumineuses et l'ensilage de maïs non inoculés (1GLC et 2GLC), deux fermes utilisant l'ensilage de graminées ou de légumineuses et l'ensilage de maïs inoculés (2GLICI et 6GLICI) et finalement, deux fermes utilisant le foin (5H et 6H). Pour ce faire, des laits crus ont été prélevés avec la même méthodologie que celle présentée au chapitre 2. Un dénombrement bactérien a été réalisé sur MRS-BPB avant (T0) et après pasteurisation du lait (T1) (figure 5.2). Les deux seules fermes où des LAB thermorésistantes ont été retrouvées sont celles où le troupeau recevait des ensilages d'herbe et de maïs non inoculés. Les isolats avaient initialement été identifiés comme *E. faecium*, *E. faecalis* et *L. casei/paracasei* (tableau 5.2). Cependant, le séquençage de cette dernière souche l'a plutôt identifiée comme *L. delbrueckii*, contenant deux plasmides appartenant à *L. casei/paracasei* (données non présentées). L'effet de la souche *L. delbrueckii* RKG R10 sur la production modèle de cheddar a d'ailleurs été évalué au chapitre 3. Une souche de *Kocuria rhizophila/arsenatis* a aussi été isolée dans la ferme 2GICI utilisant des ensilages d'herbe et de maïs inoculés.

**Tableau 5.1.** Bactéries lactiques isolées de laits après un traitement de pasteurisation (73°C, 16 s) provenant de deux fermes utilisant l'ensilage de graminées ou de légumineuses, ainsi que l'ensilage de maïs.

Code	Groupe taxonomique	Ferme <sup>1</sup>
RKG R01	<i>Enterococcus faecalis</i>	2GLC
RKG R02	<i>Enterococcus faecalis</i>	2GLC
RKG R03	<i>Enterococcus faecium</i>	2GLC
RKG R04	<i>Enterococcus faecalis</i>	2GLC
RKG R10	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1GLC

<sup>1</sup>GLC : Ensilage de graminées et de légumineuses et l'ensilage de maïs non inoculés

À la lumière de ces résultats, il serait souhaitable d'éviter les inoculants contenant des souches appartenant au genre *Enterococcus*, car leur thermorésistance et leur capacité à modifier la saveur du fromage sont reconnues (McAuley et al., 2012; Cárdenas et al., 2016; Fox et al., 2017e). Les souches thermorésistantes d'*E. faecalis* testées dans le modèle expérimental de production de Cheddar (chapitre 3) ont d'ailleurs démontré une croissance similaire au ferment. Certaines souches étaient également tolérantes au sel. De surcroît, il arrive que les entérocoques soient des pathogènes pour l'homme et la vache, en plus d'être capable d'acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Cameron et al., 2016; Bintsis, 2018; Nomura et al., 2018).



**Figure 5.2.** Comptes viables avant (T0) et après pasteurisation du lait cru (T1) pour sept fermes utilisant différents types d'alimentation. GL correspond à l'ensilage de graminées et de légumineuses, C à l'ensilage de maïs et H au foin. I correspond à l'ensilage inoculé.

### 5.3 Litière de fumier recyclé

Comme mentionné au chapitre 4, la litière de fumier recyclé semble représenter un risque pour la qualité microbiologique du lait en augmentant l'abondance de streptocoques et d'*E. faecalis*. Par contre, l'utilisation de ce type de litière est encore très marginale et son procédé de fabrication n'est pas uniforme et standardisé d'une ferme à l'autre. Comme il s'agit d'un procédé innovant et très intéressant dans un contexte de développement durable (Bradley et al., 2014; Fournel et al., 2019b), il serait important d'améliorer le procédé de fabrication pour limiter ces types de microorganismes. Fournel et al. (2019a) ont d'ailleurs démontré que l'augmentation du temps de compostage semblait faire diminuer la quantité d'entérocoques. Les auteurs ont aussi démontré que la quantité de streptocoques était plus faible lorsque le compostage était réalisé en andains avec des retournements. Des efforts de recherche devraient continuer en ce sens, afin de donner des conseils avisés aux producteurs laitiers désirant utiliser cette litière. Finalement, la traite des vaches installées sur la litière de fumier recyclé devrait être faite avec un respect strict des techniques recommandées par le *National Mastitis Council* et les Producteurs de lait du Canada, afin de diminuer la contamination microbienne provenant de la surface du pis.

## 5.4 Le microbiote du lait

Le microbiote du lait est constitué d'un assemblage de bactéries provenant de différentes sources. De manière globale, ces communautés bactériennes ont des similarités d'un lait à l'autre (Kable et al., 2016). C'est ce qui a été observé au chapitre 2 et 4. Dans les LAB mésophiles, le groupe *L. casei* était dominant, ainsi que *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis/garlicum*, *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus plantarum*. Pour les LAB thermorésistantes, les entérocoques, les streptocoques et *L. lactis/garlicum* étaient les groupes dominants. Finalement, pour ce qui est des sporulés, le genre *Bacillus* et plus spécifiquement l'espèce *Bacillus licheniformis* était le plus dominant, peu importe le type de lait. Les résultats obtenus dans cette thèse confirment toutefois que les pratiques de gestion à la ferme ont un certain impact sur la qualité microbiologique du lait. Cela est dans la même lignée que plusieurs études scientifiques, dont celles de Vacheyrou et al. (2011), Skeie et al., (2019) et Driehuis et al. (2016). Il demeure donc important d'identifier les sources critiques qui mènent à des défauts en fromagerie. Il est d'autant plus avantageux d'évaluer les nouvelles pratiques de gestion à la ferme avant qu'elles ne soient implantées intensivement.

Les pratiques à la ferme comme le pâturage et le type de litière ont un impact direct sur le microbiote du pis de la vache (Rowbotham and Ruegg, 2016; Frétin et al., 2018) et celui-ci module le microbiote du lait. Selon Gleeson et al. (2013), la contamination du lait par les bactéries thermoduriques et thermorésistantes comme *Bacillus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* provient de la contamination des trayons et la contamination du matériel de traite. Donc pour les producteurs laitiers, il est primordial de respecter à la lettre les pratiques d'hygiène lors de la traite. Cela est d'autant plus vrai pour les producteurs utilisant la litière de fumier recyclé qui contient une grande charge bactérienne, comme mentionnée précédemment. D'ailleurs, les méthodes de nettoyage et de désinfections à la ferme ont un impact direct sur le microbiote du lait (Tilocca et al., 2020). En plus d'être liée à l'environnement de la ferme, la composition du microbiote du lait est modifiée lors de son transport et de son entreposage à court terme (Fricker et al., 2011; Kable et al., 2016). Comme lors de la traite, les pratiques d'hygiène lors du transport sont très importantes à respecter (Kuhn et al., 2018).

Une portion des bactéries du lait cru est en mesure de résister à la pasteurisation. Les résultats des chapitres 3 et 4, ainsi que ceux présentés à la section 5.2 indiquent qu'une attention doit être portée au genre *Enterococcus* et *Streptococcus* et à l'espèce *L. plantarum*. En général, les bactéries en forme de coques ont une résistance plus élevée à la chaleur que les bacilles. La structure et la composition des cellules a aussi un impact (Cebrián et al., 2017). Les mécanismes de résistance sont eux aussi très importants. Les gènes de résistance doivent être présents (Ricciardi et al., 2012), mais l'expression de ces gènes et la production des protéines sont d'autant plus importantes (Chen and Lu, 2018).

## 5.5 Perspectives

### 5.5.1 De nouveaux inoculants

Les transformateurs laitiers sont préoccupés par l'ensilage, car il est un vecteur de spores butyriques notamment de *Clostridium tyrobutyricum*. La concentration de *Clostridium* dans l'ensilage de maïs est plus élevée que dans l'ensilage d'herbe. Elle peut atteindre  $10^5$  par g d'ensilage (Kalač, 2011; Driehuis, 2013). Comme cette bactérie résiste à la pasteurisation du lait grâce à ses spores, il est important de limiter sa présence dans l'ensilage. La baisse rapide du pH permet de limiter en partie ces bactéries indésirables. Donc, l'utilisation d'homofermentaires comme inoculant est souhaitable (Queiroz et al., 2018). Des stratégies comme l'utilisation d'inoculant producteur de bactériocines contre les clostridies ont déjà été envisagées (Muck et al., 2018a). Toutefois, il peut sembler difficile de trouver de telles bactéries considérant que sur 1239 isolats testés seulement une souche (*Lactococcus lactis* RKG 2-85) a permis d'inhiber la croissance de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755. De plus, la production de bactériocine est influencée par plusieurs paramètres dont le pH, la température et le milieu de culture (Venegas-Ortega et al., 2019). Donc, en conditions d'ensilage, une souche productrice de bactériocine contre *C. tyrobutyricum* ne produira pas nécessairement son effet antibactérien. Un criblage de souches isolées directement de l'ensilage serait à privilégier.

Bien que représentant un coût pour le producteur (Borreani et al., 2018), l'inoculation permet de s'assurer de la qualité de celui-ci. Dans un contexte de changements climatiques, l'inoculation avec des hétérofermentaires risque d'être de plus en plus souhaitable. En effet, l'augmentation de la chaleur favorise la croissance des levures et des moisissures. Donc les ensilages soumis aux chaudes températures est plus susceptibles de subir une instabilité aérobie (Bernardes et al., 2018). En plus, de générer une perte dans la qualité et la quantité de l'ensilage, l'instabilité aérobie permet la croissance de mycètes pouvant libérer des mycotoxines (Driehuis, 2013; Bernardes et al., 2018). Ces toxines représentent un risque pour la santé des vaches de même que pour les producteurs laitiers. Il a été largement démontré que l'inoculation avec *L. buchneri* améliore la stabilité aérobie en produisant de l'acide acétique en grande quantité (Muck, 2013). Outre l'acide acétique, d'autres métabolites bactériens comme l'acide propionique et l'acide phényllactique ont démontré des effets antifongiques (Valerio et al., 2004; Gharechahi et al., 2017). Des inoculants bactériens hautement producteurs de composés antifongiques semblent une avenue intéressante. En plus des mycotoxines produites lors d'une instabilité aérobie, l'ensilage peut contenir des mycotoxines étant déjà présentes dans les plantes fourragères. Il a été démontré que certaines bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* sont en mesure d'avoir un effet détoxifiant (Kalač, 2011). Dans le futur, il serait possible d'envisager des inoculants avec des propriétés détoxifiantes.

Dans un contexte de développement durable, il est avantageux pour les producteurs laitiers de produire un ensilage à haute teneur nutritive qui améliore les performances de la vache laitière tout en réduisant les coûts de production et les pertes environnementales. Il a déjà été démontré que certains inoculants avaient un effet probiotique sur la vache (Ellis et al., 2016). L'utilisation d'un inoculant lactique en mesure de synthétiser des biomolécules contenant du sélénium en plus d'améliorer la stabilité aérobie ou encore en mesure de réduire les émanations de méthane serait une bonne innovation. En effet, le sélénium est primordial pour la santé de la vache, car il améliore son immunité et sa reproduction (Séboussi et al., 2016). Cependant, les sols de l'est-canadien sont pauvres en sélénium et ainsi une supplémentation dans l'alimentation de la vache ou dans les sols est nécessaire (Øgaard et al., 2006; Séboussi et al., 2016). Il a été démontré que la bioconversion du sélénium par LAB améliore sa biodisponibilité (Saini et al., 2014). D'ailleurs cela a déjà été testé dans l'alimentation ovine (Lee et al., 2019).

Peu importe à quel type d'inoculant le futur favorisera, il serait souhaitable que les compagnies productrices d'inoculants testent leurs souches pour leur thermorésistance et leur propriété à acidifier le lait. Cela permettrait d'identifier les candidats les moins susceptibles d'affecter la transformation laitière. Pour la thermorésistance, il serait intéressant de développer un test génétique basé sur la présence de gènes codant pour des « *heat shock proteins* », plutôt que cela soit fait par une caractérisation phénotypique.

### 5.5.2 Identification d'autres sources de contamination du lait

L'ensilage est partie intégrante de l'alimentation de la vache laitière. Par contre, il existe plusieurs autres composantes dans leurs aliments comme les moulées, le maïs humide, les suppléments alimentaires, etc. Un intérêt sur la teneur en bactéries thermorésistantes serait intéressant. Les engrains de types organiques pourraient aussi être investigués. Finalement, dans l'environnement de la ferme et de l'usine de transformation, les bactéries peuvent subir plusieurs stress. La formation de biofilm est un mécanisme de résistance à différents stress (Papadimitriou et al., 2016). Plusieurs espèces thermorésistantes et thermoduriques comme *S. thermophilus* et *B. cereus* ont la capacité de former des biofilms dans un environnement laitier ce qui peut contribuer à leur implantation dans une usine de transformation laitière (Kumari and Sarkar, 2014; Chamberland et al., 2017; Fox et al., 2017d). Un intérêt dans le futur devra être porté sur la production de biofilm laitier par les bactéries thermorésistantes du lait.

### 5.5.3 Utilisation de ferments d'appoint

Comme évoqué précédemment le microbiote du lait est tributaire de l'environnement dans lequel il est produit. Skeie et al. (2019) ont d'ailleurs démontré plusieurs changements dans la composition du microbiote du lait cru entre les échantillons d'une même ferme sans toutefois pouvoir les expliquer. Il arrive aussi que des

problèmes dans la qualité microbiologique du lait surviennent de manière sporadique. Dans cette optique, il semble difficile de contrôler et de comprendre tous les paramètres de la composition microbiologique du lait. De surcroît, lorsque les fromages sont faits de laits de mélange, la qualité est d'autant compromise lors du transport de la ferme à l'usine.

Pour les transformateurs laitiers, un des outils qui permet de contrôler cette variation est la pasteurisation (Fox et al., 2017a). Cependant, celle-ci n'élimine pas toute la charge microbienne du lait et laisse des bactéries thermodynamiques comme les sporulés et des LAB thermorésistantes. Même si les NSLAB sont présentes en faible quantité dans le lait de départ, elles peuvent dominer lors de l'affinage du fromage (Blaya et al., 2018). Comme démontré dans le chapitre 3, *L. plantarum* RKG 2-212 ne s'est pas trop développé lors de la production du cheddar, mais a eu une croissance importante lors de l'affinage. Il est aussi possible de croire que les souches d'*E. faecalis* testées dans le chapitre 4 qui ont démontré une forte croissance pendant la production du cheddar et qui sont tolérantes au sel pourraient aussi croître fortement pendant l'affinage.

La présence de LAB dans un environnement laitier semble limiter la présence des bactéries d'altération (Stellato et al., 2015). Il semble donc très intéressant pour le fromager d'utiliser des fermentations d'appoint, afin de limiter les problèmes liés à la flore secondaire. Comme ils sont ajoutés en plus grande quantité que les NSLAB, ils entreront en compétition avec la flore secondaire et il est possible de croire qu'ils limiteront leur croissance pendant l'affinage (Fox et al., 2017e). Le fromager peut ainsi à l'avance choisir des souches de fermentations d'appoint qui contribueront à la saveur de leur fromage plutôt que de causer des défauts organoleptiques de manière aléatoire. En effet, ces fermentations peuvent améliorer et diversifier les saveurs d'un fromage (Cuffia et al., 2020). Leur utilisation, principalement les souches de *L. casei*, a débuté pour pallier le faible compte de LAB dans le lait (Fox et al., 2017g). Les lactobacilles ont une machinerie enzymatique élaborée leur permettant de contribuer à la saveur des fromages lors de l'affinage (Stefanovic et al., 2017a; Pangallo et al., 2019). Leurs capacités métaboliques et donc leurs effets dans le fromage sont souche-dépendantes (Stefanovic et al., 2017b; Stefanovic and McAuliffe, 2018). Il est possible de faire un criblage pour leur capacité à générer des composés volatils dans des modèles expérimentaux de fromage comme les caillés modèles qui ont été utilisés au chapitre 3. Stefanovic et al., (2017c) ont aussi testé plusieurs souches du groupe *L. casei*, tandis que Pogačić et al. (2015) ont testé différentes espèces de LAB (*Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus helveticus*) avec cette approche. Le ferment d'appoint, en plus d'améliorer la saveur d'un fromage, peut aussi accélérer la période d'affinage (Fox et al., 2017b; c).

Plusieurs agents pathogènes ou d'altération peuvent provenir du lait, comme *C. tyrobutyricum*. L'utilisation de souches productrices de bactériocine comme ferment d'appoint peut être utile pour lutter contre ceux-ci (Mathot et al., 2003; Bogović Matijašić et al., 2007). Par contre, il arrive que ces souches interfèrent avec

la viabilité du ferment lactique ou encore produisent des saveurs impropres (Fox et al., 2017e). Comme mentionné précédemment, tester ces souches dans un modèle expérimental est primordial.

## Conclusion générale

Pour les transformateurs laitiers, la qualité microbiologique des fromages est au cœur de leurs préoccupations, car les caractéristiques finales des produits sont tributaires des bactéries qu'ils contiennent. Par le passé, la plupart des études pourtant sur ce sujet s'intéressaient peu à la provenance du lait et la manière dont il était produit. Cela est probablement attribuable au fait que les fromages produits à grande échelle sont majoritairement faits de laits de mélange. Dans le même sens, les études réalisées sur les différentes pratiques de gestion à la ferme avaient principalement comme objectif d'augmenter la production de lait ou encore d'améliorer la santé de la vache. L'effet de ces différentes pratiques sur la qualité microbiologique du lait a donc été négligé. En revanche, les travaux innovants présentés dans cette thèse se sont focalisés sur le continuum de la ferme à l'usine. L'hypothèse à la base de ces travaux était que le développement de défauts d'origine microbienne ou organoleptiques lors de la fabrication ou la maturation du fromage cheddar est attribuable à la présence d'une partie de la population bactérienne du lait cru. Cette hypothèse a été vérifiée en évaluant l'impact des bactéries lactiques thermorésistantes associées à l'utilisation de différents fourrages et de la litière de fumier recyclé sur la qualité microbiologique du lait et sur la production du fromage cheddar.

Grâce à la création d'une banque de souches et au typage de celles-ci par l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe, il a été démontré que les bactéries lactiques du lait cru ne provenaient qu'en faible nombre des fourrages utilisés dans l'alimentation de la vache laitière. De plus, dans ces travaux, l'inoculation des ensilages avec des bactéries lactiques était une grande préoccupation. L'effet bénéfique de l'inoculation sur la qualité de l'ensilage a largement été évalué dans des études précédentes. Cependant, ses répercussions sur les bactéries lactiques du lait n'avaient jamais été étudiées. Selon les résultats obtenus, l'inoculation ne semble pas être une pratique problématique pour la qualité microbiologique du lait. Ces résultats ont été obtenus grâce à la comparaison des bactéries isolées des inoculants commerciaux aux bactéries isolées dans le lait cru.

Bien que l'ensilage soit une source de contamination mineure en bactéries lactiques pour le lait, il a toutefois été démontré dans cette thèse que certaines souches peuvent être thermorésistantes et ainsi peuvent contribuer à la flore secondaire des fromages. À l'aide des modèles expérimentaux de production de cheddar, il a été possible d'évaluer les effets indésirables de la souche *Lactobacillus plantarum* RKG 2-212 provenant de l'ensilage de maïs non inoculé. Ces effets dont l'acidification de la pâte et la production de composés volatils imprévisibles au cheddar ont été observés pendant l'affinage. Cela a été possible grâce au développement d'une méthode pour extraire les composés volatils des caillés modèles. Le séquençage du génome de cette souche a facilité la compréhension des résultats obtenus. Une validation dans une production de cheddar serait toutefois souhaitable, car l'affinage accéléré (12 jours à 30 °C) ne reflète pas toujours exactement l'affinage traditionnel (6 mois à 4 °C). De plus, les défauts de texture pourraient être évalués, car cela n'est pas possible avec les

caillés modèles. De surcroît, il serait intéressant d'évaluer l'effet sur la production de cheddar de différentes souches et de différentes espèces de bactéries lactiques associées à l'ensilage.

Lorsque de nouvelles pratiques de gestion à la ferme commencent à s'implanter comme l'utilisation de la litière de fumier recyclé, il est particulièrement intéressant d'évaluer leur influence sur la qualité du lait avant que celles-ci ne soient répandues. Cela permet de comprendre les risques qui y sont associés. Les travaux portant sur la litière de fumier recyclé ont montré une augmentation des *Enterococcus faecalis* et de *Streptococcus* thermorésistants dans le lait. Cette augmentation pourrait être problématique considérant leur potentiel pathogène. De plus, quatre souches d'*E. faecalis* et une souche de *Streptococcus thermophilus* ont démontré une forte croissance pendant la production modèle de cheddar. Cela pourrait être problématique lors de l'affinage et d'autant plus lorsqu'il s'agit de souches protéolytiques. Une validation en production réelle serait souhaitable. Ces résultats ont aussi démontré qu'il serait important d'optimiser le procédé de fabrication de la litière de fumier recyclé, afin de réduire les entérocoques et les streptocoques thermorésistants. De plus, les transformateurs laitiers seront plus au fait des risques que la litière de fumier recyclé représente.

En conclusion, les travaux présentés dans cette thèse ont démontré que la qualité microbiologique des laits et donc celle des fromages sont en partie dépendantes des pratiques de gestion à la ferme. En effet, l'alimentation de la vache dont l'ensilage, ainsi que la litière sont des vecteurs de bactéries lactiques thermorésistantes dans le lait. Ceux-ci pourraient éventuellement avoir une influence lors de la production du fromage. Il demeure donc important, pour s'assurer d'obtenir un lait de qualité optimale, d'examiner l'influence des différentes pratiques de gestion à la ferme. Des études futures devraient aussi investiguer comment les bactéries véhiculées par le lait cru persistent dans les usines de transformation laitière.

# Bibliographie

- Acree, T., and H. Arn. 2020. Flavornet and human odor space. <http://www.flavornet.org/flavornet.html> [Visité le 7 avril 2020].
- Aertsen, A., and C.W. Michiels. 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit. Rev. Microbiol.* 30:263–273. doi:10.1080/10408410490884757.
- Afshari, R., C.J. Pillidge, E. Read, S. Rochfort, D.A. Dias, A.M. Osborn, and H. Gill. 2020. New insights into cheddar cheese microbiota-metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi-omics data. *Sci. Rep.* 10:3164. doi:10.1038/s41598-020-59617-9.
- Alemayehu, D., J. a Hannon, O. McAuliffe, and R.P. Ross. 2014. Characterization of plant-derived lactococci on the basis of their volatile compounds profile when grown in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 172:57–61. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.024.
- Ashraf, R., and N.P. Shah. 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. *Int. J. Food Microbiol.* 149:194–208. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008>.
- Auldist, M.J., S. Coats, B.J. Sutherland, J.J. Mayes, G.H. McDowell, and G.L. Rogers. 1996. Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 63:269. doi:10.1017/S0022029900031769.
- Aydin, C.M. 2017. Formation of volatile and non-volatile compounds in cheese. *Int. J. Sci. Technol. Res.* 6:252–263.
- Banks, J.M., and A.G. Williams. 2004. The role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57:145–152. doi:10.1111/j.1471-0307.2004.00150.x.
- Bassi, D., F. Cappa, S. Gazzola, L. Orrù, and P.S. Cocconcelli. 2017. Biofilm formation on stainless steel by *Streptococcus thermophilus* UC8547 in milk environments is mediated by the proteinase PrtS. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e02840-16. doi:10.1128/AEM.02840-16.
- Bassi, D., E. Puglisi, and P.S. Cocconcelli. 2015. Comparing natural and selected starter cultures in meat and cheese fermentations. *Curr. Opin. Food Sci.* 2:118–122. doi:10.1016/j.cofs.2015.03.002.

- De Angelis, M., R. Di Cagno, C. Huet, C. Crecchio, P.F. Fox, and M. Gobbetti. 2004. Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1336–1346. doi:10.1128/AEM.70.3.1336-1346.2004.
- De Angelis, M., and M. Gobbetti. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*. 4:106–122. doi:10.1002/pmic.200300497.
- Di Bella, J.M., Y. Bao, G.B. Gloor, J.P. Burton, and G. Reid. 2013. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J. Microbiol. Methods*. 95:401–14. doi:10.1016/j.mimet.2013.08.011.
- Beresford, T.P., N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan, and T.M. Cogan. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11:259–274. doi:10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- Bernardes, T.F., J.L.P. Daniel, A.T. Adesogan, T.A. McAllister, P. Drouin, L.G. Nussio, P. Huhtanen, G.F. Tremblay, G. Bélanger, and Y. Cai. 2018. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *J. Dairy Sci.* 101:4001–4019. doi:10.3168/jds.2017-13703.
- Bielecka, M.M., and G. Cichosz. 2017. The influence of an adjunct culture of *Lactobacillus paracasei* LPC-37 on the physicochemical properties of Dutch-type cheese during ripening. *LWT - Food Sci. Technol.* 83:95–100. doi:10.1016/j.lwt.2017.05.004.
- Bintsis, T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol.* 4:665–684. doi:10.3934/microbiol.2018.4.665.
- Blajman, J.E., R.B. Páez, C.G. Vinderola, M.S. Lingua, and M.L. Signorini. 2018. A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 125:1655–1669. doi:10.1111/jam.14084.
- Blaya, J., Z. Barzideh, and G. LaPointe. 2018. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *J. Dairy Sci.* 101:3611–3629. doi:10.3168/jds.2017-13345.
- Boers, S.A., W.A. van der Reijden, and R. Jansen. 2012. High-throughput multilocus sequence typing: bringing molecular typing to the next level. *PLoS One*. 7:e39630. doi:10.1371/journal.pone.0039630.
- Bogicevic, B., P. Fuchsmann, K. Breme, R. Portmann, B. Guggenbühl, and S. Irmler. 2013. A preliminary study on the effect of *Lactobacillus casei* expressing cystathionine lyase1/cystathionine lyase2 on Cheddar cheese and the formation of sulphur-containing compounds. *Int. Dairy J.* 33:97–103.

doi:10.1016/j.idairyj.2013.05.005.

Bogovič Matijašić, B., M. Koman Rajšp, B. Perko, and I. Rogelj. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *Int. Dairy J.* 17:157–166. doi:10.1016/j.idairyj.2006.01.011.

Borreani, G., and E. Tabacco. 2010. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. *J. Dairy Sci.* 93:2620–2629. doi:10.3168/jds.2009-2919.

Borreani, G., E. Tabacco, R.J. Schmidt, B.J. Holmes, and R.E. Muck. 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101:3952–3979. doi:10.3168/jds.2017-13837.

Bouchard, D.S., B. Seridan, T. Saraoui, L. Rault, P. Germon, C. Gonzalez-Moreno, F.M.E. Nader-Macias, D. Baud, P. François, V. Chuat, F. Chain, P. Langella, J. Nicoli, Y. Le Loir, and S. Even. 2015. Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: Potential allies against bovine mastitis. *PLoS One.* 10:1–18. doi:10.1371/journal.pone.0144831.

Bradley, A.J., K.A. Leach, S.C. Archer, J.E. Breen, and M.J. Green. 2014. Scoping study on the potential risks (and benefits) of using recycled manure solids as bedding for dairy cattle. Report prepared for DairyCo. <https://dairy-ahdb-org-uk.acces.bibl.ulaval.ca/resources-library/technical-information/buildings/rms-bedding> [Visité le 15 avril 2019].

Bradley, A.J., K.A. Leach, M.J. Green, J. Gibbons, I.C. Ohnstad, D.H. Black, B. Payne, V.E. Prout, and J.E. Breen. 2018. The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk – A cross sectional study of UK farms. *Int. J. Food Microbiol.* 269:36–45. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.022.

Brettin, T., J.J. Davis, T. Disz, R.A. Edwards, S. Gerdes, G.J. Olsen, R. Olson, R. Overbeek, B. Parrello, G.D. Pusch, M. Shukla, J.A. Thomason, R. Stevens, V. Vonstein, A.R. Wattam, and F. Xia. 2015. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* 5:8365. doi:10.1038/srep08365.

Broberg, A., K. Jacobsson, K. Ström, and J. Schnürer. 2007. Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5547–5552. doi:10.1128/AEM.02939-06.

Brody, J.R., and S.E. Kern. 2004. Sodium boric acid: A tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques.* 36:214–216. doi:10.2144/04362BM02.

Buehner, K.P., S. Anand, and A. Garcia. 2014. Prevalence of thermoduric bacteria and spores on 10 Midwest

dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97:6777–6784. doi:10.3168/jds.2014-8342.

Cai, Y., S. Kumai, M. Ogawa, Y. Benno, and T. Nakase. 1999. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2901–2906.

Cameron, M., M. Saab, L. Heider, J.T. McClure, J.C. Rodriguez-Lecompte, and J. Sanchez. 2016. Antimicrobial susceptibility patterns of environmental streptococci recovered from bovine milk samples in the maritime provinces of Canada. *Front. Vet. Sci.* 3:79. doi:10.3389/fvets.2016.00079.

Cao, Y., Y. Cai, T. Hirakubo, H. Fukui, and H. Matsuyama. 2011. Fermentation characteristics and microorganism composition of total mixed ration silage with local food by-products in different seasons. *Anim. Sci. J.* 82:259–266. doi:10.1111/j.1740-0929.2010.00840.x.

Čaplová, Z., D. Pangallo, L. Kraková, A. Puškárová, H. Drahovská, M. Bučková, J. Koreňová, and T. Kuchta. 2018. Detection of genes *prtP*, *pepN*, *pepX* and *bcaT* involved in formation of aroma-active compounds in lactic acid bacteria from ewes' cheese. *J. Food Nutr. Res.* 57:1–6.

Cárdenas, N., R. Arroyo, J. Calzada, Á. Peirotén, M. Medina, J.M. Rodríguez, and L. Fernández. 2016. Evaluation of technological properties of *Enterococcus faecium* CECT 8849, a strain isolated from human milk, for the dairy industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:7665–7677. doi:10.1007/s00253-016-7616-3.

Carminati, D., F. Tidona, M.E. Fornasari, L. Rossetti, A. Meucci, and G. Giraffa. 2014. Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 59:299–305. doi:10.1111/lam.12275.

Carr, F.J., D. Chill, and N. Maida. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28:281–370. doi:10.1080/1040-840291046759.

Caspia, E.L., P.C. Coggins, M.W. Schilling, Y. Yoon, and C.H. White. 2006. The relationship between consumer acceptability and descriptive sensory attributes in cheddar cheese. *J. Sens. Stud.* 21:112–127. doi:10.1111/j.1745-459X.2006.00054.x.

Cebrián, G., S. Condón, and P. Mañas. 2017. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: Mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods*. 6:107. doi:10.3390/foods6120107.

Centre canadien d'information laitière. 2019. <https://www.dairyinfo.gc.ca/fra/centre-canadien-d-information>

laitiere-accueil/?id=1425332075418 [Visité le 21 avril 2020].

Chamberland, J., M.H. Lessard, A. Doyen, S. Labrie, and Y. Pouliot. 2017. A sequencing approach targeting the 16S rRNA gene unravels the biofilm composition of spiral-wound membranes used in the dairy industry. *Dairy Sci. Technol.* 96:827–843. doi:10.1007/s13594-016-0305-2.

Champagne, C.P., R.R. Laing, D. Roy, A.A. Mafu, M.W. Griffiths, and C. White. 1994. Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34:1–30. doi:10.1080/10408399409527648.

Chen, M.M., Q.H. Liu, G.R. Xin, and J.G. Zhang. 2013. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their inoculating effects on the silage fermentation at high temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* 56:71–78. doi:10.1111/lam.12018.

Chen, W., and W. Lu. 2018. Environmental stress responses of lactic acid bacteria. In Lactic acid bacteria in foodborne hazards reduction. Springer Singapore, Singapore. 115–140.

Christiansen, P., F.K. Vogensen, E.W. Nielsen, and Y. Ardö. 2010. Potential of anticrostrial *Lactobacillus* isolated from cheese to prevent blowing defects in semihard cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 63:544–551. doi:10.1111/j.1471-0307.2010.00626.x.

Christiansen, P., E. Waagner Nielsen, F.K. Vogensen, C.-H. Brogren, and Y. Ardö. 2006. Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *Int. Dairy J.* 16:1196–1204. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.009.

Clements, L.D., B.S. Miller, and U.N. Streips. 2002. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:284–286. doi:10.1078/0723-2020-00108.

Cole, K., and J. Hogan. 2016. Short communication: Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids. *J. Dairy Sci.* 99:1501–1505. doi:10.3168/jds.2015-10238.

Contreras-Govea, F.E., R.E. Muck, G.A. Broderick, and P.J. Weimer. 2013. *Lactobacillus plantarum* effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179:61–68. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.11.008.

Coorevits, A., V. De Jonghe, J. Vandromme, R. Reekmans, J. Heyrman, W. Messens, P. De Vos, and M.

Heyndrickx. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Syst. Appl. Microbiol.* 31:126–140.  
doi:10.1016/j.syapm.2008.03.002.

Crow, V., B. Curry, and M. Hayes. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int. Dairy J.* 11:275–283. doi:10.1016/S0958-6946(01)00057-7.

Cuffia, F., C. V Bergamini, É.R. Hynes, I. V Wolf, and M.C. Perotti. 2020. Evaluation of autochthonous cultures to improve the cheese flavor: A case study in hard cheese model. *Food Sci. Technol. Int.* 26:173–184.  
doi:10.1177/1082013219881512.

Cuffia, F., C. V Bergamini, I. V Wolf, E.R. Hynes, and M.C. Perotti. 2018. Characterization of volatile compounds produced by *Lactobacillus helveticus* strains in a hard cheese model. *Food Sci. Technol. Int.* 24:67–77. doi:10.1177/1082013217728628.

Dandoy, D., C. Fremaux, M. Henry de Frahan, P. Horvath, P. Boyaval, P. Hols, and L. Fontaine. 2011. The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb. Cell Fact.* 10:S21.  
doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S21.

Darchuk, E.M., J. Waite-Cusic, and L. Meunier-Goddik. 2015. Effect of commercial hauling practices and tanker cleaning treatments on raw milk microbiological quality. *J. Dairy Sci.* 98:7384–7393.  
doi:10.3168/jds.2015-9746.

De Jonghe, V., A. Coorevits, J. De Block, E. Van Coillie, K. Grijspoor, L. Herman, P. De Vos, and M. Heyndrickx. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 136:318–325. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007.

Derakhshani, H., K.B. Fehr, S. Sepehri, D. Francoz, J. De Buck, H.W. Barkema, J.C. Plaizier, and E. Khafipour. 2018. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J. Dairy Sci.* 101:10605–10625.  
doi:10.3168/jds.2018-14860.

Desfossés-Foucault, E., V. Dussault-Lepage, C. Le Boucher, P. Savard, G. Lapointe, D. Roy, É. Desfossés-Foucault, V. Dussault-Lepage, C. Le Boucher, P. Savard, G. Lapointe, and D. Roy. 2012. Assessment of probiotic viability during cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. *Front. Microbiol.* 3:350. doi:10.3389/fmicb.2012.00350.

- Desfossés-Foucault, É., G. LaPointe, and D. Roy. 2013. Dynamics and rRNA transcriptional activity of lactococci and lactobacilli during Cheddar cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 166:117–124. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.022.
- Desfossés-Foucault, É., G. LaPointe, and D. Roy. 2014. Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. *Int. J. Food Microbiol.* 178:76–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.004.
- Diep, D.B., D. Straume, M. Kjos, C. Torres, and I.F. Nes. 2009. An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides.* 30:1562–1574. doi:10.1016/j.peptides.2009.05.014.
- Di Lena, M., G.M. Quero, E. Santovito, J. Verran, M. De Angelis, and V. Fusco. 2015. A selective medium for isolation and accurate enumeration of *Lactobacillus casei*-group members in probiotic milks and dairy products. *Int. Dairy J.* 47:27–36. doi:10.1016/j.idairyj.2015.01.018.
- Dolci, P., E. Tabacco, L. Cocolin, and G. Borreani. 2011. Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7499–7507. doi:10.1128/AEM.05050-11.
- Dong, A.-R., V.T. Thuy Ho, R. Lo, N. Bansal, and M.S. Turner. 2017. A genetic diversity study of antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates. *Food Control.* 72:83–89. doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.026.
- Doyle, C.J., D. Gleeson, P.W. O'Toole, and P.D. Cotter. 2017. Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota: a high-throughput sequencing study. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e02694-16. doi:10.1128/AEM.02694-16.
- Drake, S.L., P.D. Gerard, and M.A. Drake. 2008. Consumer preferences for mild Cheddar cheese flavors. *J. Food Sci.* 73:S449–S455. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00960.x.
- Driehuis, F. 2013. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agric. Food Sci.* 22:16–34. doi:10.23986/afsci.6699.
- Driehuis, F., J. Hoolwerf, and J.L.W. Rademaker. 2016. Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. *Int. Dairy J.* 63:70–77. doi:10.1016/j.idairyj.2016.08.004.
- Driehuis, F., E. Lucas-van den Bos, and M.H.J. Wells-Bennik. 2013. Risico's van het gebruik van gescheiden mest als beddingsmateriaal voor de melkkwaliteit: sporen van *Bacillus cereus* en boterzuurbacteriën. (Risks

of the use of cattle manure solids as bedding material for milk quality: *Bacillus cereus* and butyric acid bacte. NIZO-Rapport E 2013/180 pp. NIZO Food Research BV, Ede, the Netherlands

Driehuis, F., E. Lucas-van den Bos, and M.H.J. Wells-Bennik. 2014. Sporen van thermofiele aërobe sporevormers in compost en andere beddingmaterialen bij melkveebedrijven met een vrijloop- of ligenboxenstal. (Spores of thermophilic aerobic sporeformers in compost and other bedding materials used by dairy farmers). NIZO-Rapport E 2014/045 pp. NIZO Food Research BV, Ede, the Netherlands

Dunière, L., J. Sindou, F. Chaucheyras-Durand, I. Chevallier, and D. Thévenot-Sergentet. 2013. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 182:1–15. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006.

Ellis, J.L., A. Bannink, I.K. Hindrichsen, R.D. Kinley, W.F. Pellikaan, N. Milora, and J. Dijkstra. 2016. The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 211:61–74. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.10.016.

Ercolini, D. 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3148–3155. doi:10.1128/AEM.00256-13.

Ercolini, D., F. Russo, I. Ferrocino, and F. Villani. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol.* 26:228–231. doi:10.1016/j.fm.2008.09.005.

Fadul-Pacheco, L., D. Pellerin, P.Y. Chouinard, M.A. Wattiaux, M. Duplessis, and É. Charbonneau. 2017. Nitrogen efficiency of eastern Canadian dairy herds: Effect on production performance and farm profitability. *J. Dairy Sci.* 100:6592–6601. doi:10.3168/jds.2016-11788.

Falentin, H., L. Rault, A. Nicolas, D.S. Bouchard, J. Lassallas, P. Lamberton, J.-M. Aubry, P.-G. Marnet, Y. Le Loir, and S. Even. 2016. Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. *Front. Microbiol.* 7:480. doi:10.3389/fmicb.2016.00480.

Felis, G.E., and F. Dellaglio. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8:44–61.

Fernandez, B., R. Hammami, P. Savard, J. Jean, and I. Fliss. 2013. *Pediococcus acidilactici* UL5 and *Lactococcus lactis* ATCC 11454 are able to survive and express their bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions. *J. Appl. Microbiol.* 116:677–688. doi:10.1111/jam.12391.

- Fernandez, B., P. Savard, and I. Fliss. 2016. Survival and metabolic activity of pediocin producer *Pediococcus acidilactici* UL5: Its impact on intestinal microbiota and *Listeria monocytogenes* in a model of the human terminal ileum. *Microb. Ecol.* 72:931–942. doi:10.1007/s00248-015-0645-0.
- Field, D., R.P. Ross, and C. Hill. 2018. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Curr. Opin. Food Sci.* 20:1–6. doi:10.1016/j.cofs.2018.02.004.
- Filannino, P., M. De Angelis, R. Di Cagno, G. Gozzi, Y. Riciputi, and M. Gobbetti. 2018. How *Lactobacillus plantarum* shapes its transcriptome in response to contrasting habitats. *Environ. Microbiol.* 20:3700–3716. doi:10.1111/1462-2920.14372.
- Fournel, S., S. Godbout, P. Ruel, A. Fortin, K. Duquette-Lozeau, V. Létourneau, M. Généreux, J. Lemieux, D. Potvin, C. Côté, C. Duchaine, and D. Pellerin. 2019a. Production of recycled manure solids for use as bedding in Canadian dairy farms: II. Composting methods. *J. Dairy Sci.* 102:1847–1865. doi:10.3168/jds.2018-14967.
- Fournel, S., S. Godbout, P. Ruel, A. Fortin, M. Généreux, C. Côté, C. Landry, and D. Pellerin. 2019b. Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms: I. Solid–liquid separation. *J. Dairy Sci.* 102:1832–1846. doi:10.3168/jds.2018-14966.
- Fournel, S., S. Godbout, P. Ruel, A. Fortin, M. Généreux, K. Duquette-Lozeau, V. Létourneau, J. Lemieux, D. Potvin, C. Côté, C. Duchaine, and D. Pellerin. 2018. Production of recycled manure solids used as bedding for dairy cows in Canada: analysis of solid-liquid separation and composting methods. In 10th International Livestock Environment Symposium (ILES X). American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, MI. 1.
- Fox, P.F., and T.M. Cogan. 2004. Factors that affect the quality of cheese. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. T.P.G. Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan, editors. Elsevier. 583–608.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017a. Overview of cheese manufacture. In *Fundamentals of cheese science*. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 11–25.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017b. Biochemistry of cheese ripening. In *Fundamentals of cheese science*. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 391–442.

- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017c. Factors that affect cheese quality. In Fundamentals of cheese science. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 533–542.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017d. Bacteriology of cheese milk. In Fundamentals of cheese science. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 105–120.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017e. Microbiology of cheese ripening. In Fundamentals of cheese science. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 333–390.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017f. Cheese: Historical aspects. In Fundamentals of cheese science. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 1–10.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017g. Starter cultures. In Fundamentals of cheese science. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 121–183.
- Fox, P.F., T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney. 2017h. Cheese: Structure, rheology and texture. In Fundamentals of cheese science. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 475–532.
- Franciosi, E., L. Settanni, A. Cavazza, and E. Poznanski. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *Int. Dairy J.* 19:3–11. doi:10.1016/j.idairyj.2008.07.008.
- Frétin, M., B. Martin, E. Rifa, V.-M. Isabelle, D. Pomiès, A. Ferlay, M.-C. Montel, and C. Delbès. 2018. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Sci. Rep.* 8:200. doi:10.1038/s41598-017-18447-y.
- Fricker, M., B. Skånseng, K. Rudi, B. Stessl, and M. Ehling-Schulz. 2011. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 145 Suppl:S24-30. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025.
- Fujimoto, J., K. Tanigawa, Y. Kudo, H. Makino, and K. Watanabe. 2011. Identification and quantification of viable *Bifidobacterium breve* strain Yakult in human faeces by using strain-specific primers and

propidium monoazide. *J. Appl. Microbiol.* 110:209–217. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04873.x.

Gagnon, M., L. Hamelin, A. Fréchette, S. Dufour, and D. Roy. 2020a. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *J. Dairy Sci.* 103:128–140. doi:10.3168/jds.2019-16812.

Gagnon, M., A.J. Kennang Ouamba, C. Goulet, G. LaPointe, P.Y. Chouinard, and D. Roy. 2020b. Prevalence and abundance of lactic acid bacteria in raw milk associated with forage types in dairy cow feeding. *J. Dairy Sci.* Accepté

Gagnon, M., P. Savard, A. Rivière, G. LaPointe, and D. Roy. 2015. Bioaccessible antioxidants in milk fermented by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains. *Biomed Res. Int.* 2015:169381. doi:10.1155/2015/169381.

Ganesan, B., M.R. Stuart, and B.C. Weimer. 2007. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2498–2512. doi:10.1128/AEM.01832-06.

Gänzle, M.G. 2015. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* 2:106–117. doi:10.1016/j.cofs.2015.03.001.

Gelsomino, R., M. Vancanneyt, T.M. Cogan, S. Condon, and J. Swings. 2002. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3560–3565. doi:10.1128/AEM.68.7.3560-3565.2002.

Gharechahi, J., Z.A. Kharazian, S. Sarikhan, G.S. Jouzani, M. Aghdasi, and G. Hosseini Salekdeh. 2017. The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage. *Microb. Biotechnol.* 10:1663–1676. doi:10.1111/1751-7915.12751.

Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88:215–222. doi:10.1016/S0168-1605(03)00183-1.

Gleeson, D., A. O 'connell, and K. Jordan. 2013. Review of potential sources and control of thermoduric bacteria in bulk-tank milk. *Irish J. Agric. Food Res.* 52:217–227.

Gobbetti, M., M. De Angelis, R. Di Cagno, L. Mancini, and P.F. Fox. 2015. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 45:167–178. doi:10.1016/j.tifs.2015.07.016.

- Gobbetti, M., R. Di Cagno, M. Calasso, E. Neviani, P.F. Fox, and M. De Angelis. 2018. Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends Food Sci. Technol.* 78:244–254. doi:10.1016/j.tifs.2018.06.010.
- Gómez-Torres, N., S. Garde, Á. Peiroten, and M. Ávila. 2015. Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control.* 56:186–194. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.025.
- Goulet, C., M.H. Mageroy, N.B. Lam, A. Floystad, D.M. Tieman, and H.J. Klee. 2012. Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:19009–19014. doi:10.1073/pnas.1216515109.
- Grant, R.J., and A.T. Adesogan. 2018. Journal of Dairy Science silage special issue: Introduction. *J. Dairy Sci.* 101:3935–3936. doi:10.3168/jds.2018-14630.
- Guo, X.S., W.C. Ke, W.R. Ding, L.M. Ding, D.M. Xu, W.W. Wang, P. Zhang, and F.Y. Yang. 2018. Profiling of metabolome and bacterial community dynamics in ensiled *Medicago sativa* inoculated without or with *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus buchneri*. *Sci. Rep.* 8:357. doi:10.1038/s41598-017-18348-0.
- Hayaloglu, A.A., M. Guven, P.F. Fox, and P.L.H. McSweeney. 2005. Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish white-brined cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 88:3460–3474. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73030-7.
- Heinl, S., and R. Grabherr. 2017. Systems biology of robustness and flexibility: *Lactobacillus buchneri* —A show case. *J. Biotechnol.* 257:61–69. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.01.007.
- Hendriks, J., A. Oubrie, J. Castresana, A. Urbani, S. Gemeinhardt, and M. Saraste. 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1459:266–273. doi:10.1016/S0005-2728(00)00161-4.
- Henri-Dubernet, S., N. Desmasures, and M. Guéguen. 2008. Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. *Can. J. Microbiol.* 54:218–228. doi:10.1139/W07-137.
- Heras, J., C. Domínguez, E. Mata, V. Pascual, C. Lozano, C. Torres, and M. Zarazaga. 2015. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics.* 16:270. doi:10.1186/s12859-015-0703-0.
- Holzer, M., E. Mayrhuber, H. Danner, and R. Braun. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* 21:282–287. doi:10.1016/S0167-7799(03)00106-9.

- Hu, W., R.J. Schmidt, E.E. McDonell, C.M. Klingerman, and L. Kung. 2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *J. Dairy Sci.* 92:3907–3914. doi:10.3168/jds.2008-1788.
- Hu, Z., J. Chang, J. Yu, S. Li, H. Niu, S. Li, J. Chang, Z. Hu, and J. Yu. 2018. Diversity of bacterial community during ensiling and subsequent exposure to air in whole-plant maize silage. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 31:1464–1473. doi:10.5713/ajas.17.0860.
- Huck, J.R., M. Sonnen, and K.J. Boor. 2008. Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *J. Dairy Sci.* 91:1218–1228. doi:10.3168/jds.2007-0697.
- Iwasawa, A., A. Suzuki-Iwashima, F. Iida, and M. Shiota. 2014. Effects of flavor and texture on the desirability of Cheddar cheese during ripening. *Food Sci. Technol. Res.* 20:23–29. doi:10.3136/fstr.20.23.
- Jeanson, S., J. Chadœuf, M.N. Madec, S. Aly, J. Flouri, T.F. Brocklehurst, and S. Lortal. 2011. Spatial distribution of bacterial colonies in a model cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1493–500. doi:10.1128/AEM.02233-10.
- Kable, M.E., Y. Srisengfa, M. Laird, J. Zaragoza, J. McLeod, J. Heidenreich, and M.L. Marco. 2016. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio.* 7:e00836-16. doi:10.1128/mBio.00836-16.
- Kalač, P. 2011. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. *Food Chem.* 125:307–317. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.077.
- Karametsi, K., S. Kokkinidou, I. Ronningen, and D.G. Peterson. 2014. Identification of bitter peptides in aged cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 62:8034–8041. doi:10.1021/jf5020654.
- Kilcawley, K.N. 2017. Cheese flavour. In *Fundamentals of cheese science*. P.F. Fox, T.P. Guinee, T.M. Cogan, and P.L.H. McSweeney, editors. Springer US, Boston, MA. 443–474.
- Kleinschmit, D.H., and L. Kung. 2006. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. *J. Dairy Sci.* 89:3999–4004. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72443-2.
- Kuhn, E., L. Meunier-Goddik, and J.G. Waite-Cusic. 2018. Short communication: Snapshot of industry milk hauling practices in the western United States. *J. Dairy Sci.* 101:1960–1966. doi:10.3168/jds.2017-13279.

- Kumari, S., and P.K. Sarkar. 2014. Invitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control.* 36:153–158. doi:10.1016/j.foodcont.2013.08.014.
- Kung, L., R.J. Schmidt, T.E. Ebling, and W. Hu. 2007. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 90:2309–2314. doi:10.3168/jds.2006-713.
- Kung, L., R.D. Shaver, R.J. Grant, and R.J. Schmidt. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101:4020–4033. doi:10.3168/jds.2017-13909.
- Lacroix, N., D. St-Gelais, C.P. Champagne, J. Fortin, and J.-C. Vuillemar. 2010. Characterization of aromatic properties of old-style cheese starters. *J. Dairy Sci.* 93:3427–3441. doi:10.3168/jds.2009-2795.
- Lahti, L., and S. Shetty. 2017. Tools for microbiome analysis in R. Version 1.5.23. <http://microbiome.github.com/microbiome> [Visité le 14 avril 2020].
- Lawrence, R., J. Gilles, L. Creamer, V.L. Crow, H.A. Heap, C.G. Honoré, K.A. Johnston, and P.K. Samal. 2004. Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. .P.G. Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan, editors. Elsevier. 71–102.
- Layout, B.A., S.P. Walters, L.H. Lam, and A.B. Boehm. 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109:539–547. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x.
- Leach, K.A., S.C. Archer, J.E. Breen, M.J. Green, I.C. Ohnstad, S. Tuer, and A.J. Bradley. 2015. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms. *Vet. J.* 206:123–130. doi:10.1016/j.tvjl.2015.08.013.
- Lee, H.M., and Y. Lee. 2008. A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:676–681. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02371.x.
- Lee, M.R.F., H.R. Fleming, T. Cogan, C. Hodgson, and D.R. Davies. 2019. Assessing the ability of silage lactic acid bacteria to incorporate and transform inorganic selenium within laboratory scale silos. *Anim. Feed Sci. Technol.* 253:125–134. doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.05.011.
- Levante, A., F. De Filippis, A. La Storia, M. Gatti, E. Neviani, D. Ercolini, and C. Lazzi. 2017. Metabolic gene-targeted monitoring of non-starter lactic acid bacteria during cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.*

257:276–284. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.002.

Licitra, G., J.C. Ogier, S. Parayre, C. Pediliggieri, T.M. Carnemolla, H. Falentin, M.N. Madec, S. Carpino, and S. Lortal. 2007. Variability of bacterial biofilms of the “tina” wood vats used in the ragusano cheese-making process. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6980–6987. doi:10.1128/AEM.00835-07.

Lick, S., M. Keller, W. Bockelmann, and J. Heller. 1996. Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 19:74–77. doi:10.1016/S0723-2020(96)80012-9.

Lin, C., K.K. Bolson, B.E. Brent, and D.Y.C. Fung. 1992a. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J. Appl. Bacteriol.* 73:375–387. doi:10.1111/j.1365-2672.1992.tb04992.x.

Lin, C., K.K. Bolson, B.E. Brent, R.A. Hart, J.T. Dickerson, A.M. Feyerherm, and W.R. Aimutis. 1992b. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *J. Dairy Sci.* 75:2484–2493. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(92)78010-2.

Lis, D.O., J.Z. Pacha, and R.L. Górný. 2008. Bacterial contamination of the air in farmhouses. In Indoor Air, 8 (2008), pp. 17-22.

Lund, B.M., G.W. Gould, and A.M. Rampling. 2002. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *Int. J. Food Microbiol.* 77:135–145. doi:10.1016/S0168-1605(02)00057-0.

Machado, S.G., F. Baglinière, S. Marchand, E. Van Coillie, M.C.D.D. Vanetti, J. De Block, M. Heyndrickx, E. Van Coillie, M.C.D.D. Vanetti, J. De Block, and M. Heyndrickx. 2017. The Biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front. Microbiol.* 8:302. doi:10.3389/fmicb.2017.00302.

Maiden, M.C.J. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:561–588. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121325.

Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D.M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.-H. Lee, I. Díaz-Muñiz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B.

Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:15611–15616. doi:10.1073/pnas.0607117103.

Manning, D.J., and H.M. Robinson. 1973. The analysis of volatile substances associated with Cheddar-cheese aroma. *J. Dairy Res.* 40:63–75. doi:10.1017/S0022029900014369.

Mao, S., R. Zhang, D. Wang, and W. Zhu. 2012. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC Vet. Res.* 8:237. doi:10.1186/1746-6148-8-237.

Marceau, A., M. Zagorec, S. Chaillou, T. Mera, and M.-C. Champomier-Verges. 2004. Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7260–7268. doi:10.1128/AEM.70.12.7260-7268.2004.

Mariolley, L., and M.G. Casey. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90:139–159. doi:10.1016/S0168-1605(03)00304-0.

Marsh, J.W., M.M. O'Leary, K. a Shutt, S.P. Sambol, S. Johnson, D.N. Gerding, and L.H. Harrison. 2010. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and multilocus sequence typing reveal genetic relationships among *Clostridium difficile* isolates genotyped by restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* 48:412–418. doi:10.1128/JCM.01315-09.

Matamoros, S., P. Savard, and D. Roy. 2011. Genotyping of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains by multilocus variable number of tandem repeat analysis. *J. Microbiol. Methods.* 87:378–380. doi:10.1016/j.mimet.2011.10.005.

Mathot, A.G., E. Beliard, and D. Thuault. 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *J. Dairy Sci.* 86:3068–3074. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73906-X.

Mattarelli, P., B. Biavati, W. Hammes, and W.H. Holzapfel. 2014. Appendix: Guidelines for characterizing LAB, bifidobacteria and related genera for taxonomic purposes. In *Lactic Acid Bacteria*. W.H. Holzapfel and B.J.B. Wood, editors. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 583–592.

- McAllister, T.A., L. Dunière, P. Drouin, S. Xu, Y. Wang, K. Munns, and R. Zaheer. 2018. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *J. Dairy Sci.* 101:4060–4074. doi:10.3168/jds.2017-13704.
- McAuley, C.M., K.S. Gobius, M.L. Britz, and H.M. Craven. 2012. Heat resistance of thermoduric enterococci isolated from milk. *Int. J. Food Microbiol.* 154:162–168. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.033.
- McMurdie, P.J., and S. Holmes. 2013. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* 8:e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217.
- McSweeney, P. 2004. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. T.P.G. Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan, editors. Elsevier. 347–360.
- Mentana, A., A. Natale, C. Palermo, D. Nardiello, A. Conte, M.A. Del Nobile, M. Quinto, and D. Centonze. 2016. Mass spectrometry hyphenated techniques for the analysis of volatiles and peptides in soft cheese: Useful tools for the shelf life optimization. *Electrophoresis.* 37:1861–1872. doi:10.1002/elps.201500500.
- Miller, R.A., D.J. Kent, M.J. Watterson, K.J. Boor, N.H. Martin, and M. Wiedmann. 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *J. Dairy Sci.* 98:8492–8504. doi:10.3168/jds.2015-9943.
- Milosavljević, N.P., P.D. Blagojević, D.S. Savić, and N.S. Radulović. 2012. Application of HS-SPME-GC-MS-derived variables for monitoring ripening-induced changes in cheese volatile compounds. *Dairy Sci. Technol.* 92:321–333. doi:10.1007/s13594-012-0070-9.
- Moghaddam, T.K., J. Zhang, and G. Du. 2017. UvrA expression of *Lactococcus lactis* NZ9000 improve multiple stresses tolerance and fermentation of lactic acid against salt stress. *J. Food Sci. Technol.* 54:639–649. doi:10.1007/s13197-017-2493-z.
- Montel, M.-C., S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D.A. Vuitton, N. Desmasures, and F. Berthier. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177:136–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.
- Muck, R. 2013. Recent advances in silage microbiology. *Agric. Food Sci.* 22:3–15. doi:10.23986/afsci.6718.
- Muck, R.E., E.M.G. Nadeau, T.A. McAllister, F.E. Contreras-Govea, M.C. Santos, and L. Kung. 2018a. Silage

review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* 101:3980–4000.

doi:10.3168/jds.2017-13839.

Muck, R.E., E.M.G. Nadeau, T.A. McAllister, F.E. Contreras-Govea, M.C. Santos, L. Kung, G. Borreani, E. Tabacco, R.J. Schmidt, B.J. Holmes, and R.E. Muck. 2018b. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101:3952–3979. doi:10.3168/jds.2017-13839.

Muller, T., A. Ulrich, E.-M. Ott, and M. Muller. 2001. Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.* 91:268–278. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x.

Murphy, S.C., N.H. Martin, D.M. Barbano, and M. Wiedmann. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J. Dairy Sci.* 99:10128–10149. doi:10.3168/jds.2016-11172.

Murphy, S.I., D. Kent, N.H. Martin, R.L. Evanowski, K. Patel, S.M. Godden, and M. Wiedmann. 2019. Bedding and bedding management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk. *J. Dairy Sci.* 102:6885–6900. doi:10.3168/jds.2018-16022.

Murtaza, M.A., S. Ur-Rehman, F.M. Anjum, N. Huma, and I. Hafiz. 2014. Cheddar cheese ripening and flavor characterization: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54:1309–1321.  
doi:10.1080/10408398.2011.634531.

Nastasijevic, I., D. Milanov, B. Velebit, V. Djordjevic, C. Swift, A. Painset, and B. Lakicevic. 2017. Tracking of *Listeria monocytogenes* in meat establishment using Whole Genome Sequencing as a food safety management tool: A proof of concept. *Int. J. Food Microbiol.* 257:157–164.  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.015.

Nateghi, L. 2017. Identification and quantification of key volatile flavor compounds employing different adjunct starter cultures in reduced-fat Cheddar cheeses by using GC and GC-MS. *Appl. food Biotechnol.* 4:43–53. doi:10.22037/afb.v4i1.13532.

van den Nieuwboer, M., S. van Hemert, E. Claassen, and W.M. de Vos. 2016. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome. *Microb. Biotechnol.* 9:452–465.  
doi:10.1111/1751-7915.12368.

Nomura, T., Y. Hashimoto, J. Kurushima, H. Hirakawa, K. Tanimoto, B. Zheng, G. Ruan, F. Xue, J. Liu, J. Hisatsune, M. Sugai, and H. Tomita. 2018. New colony multiplex PCR assays for the detection and

discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *J. Microbiol. Methods.* 145:69–72. doi:10.1016/j.mimet.2017.12.013.

O'Driscoll, T., and C.W. Crank. 2015. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.* 8:217–230. doi:10.2147/IDR.S54125.

O'Riordan, P.J., and C.M. Delahunty. 2003. Characterisation of commercial Cheddar cheese flavour. 2: study of Cheddar cheese discrimination by composition, volatile compounds and descriptive flavour assessment. *Int. Dairy J.* 13:371–389. doi:10.1016/S0958-6946(03)00006-2.

Øgaard, A.F., T.A. Sogn, and S. Eich-Greatorex. 2006. Effect of cattle manure on selenate and selenite retention in soil. *Nutr. Cycl. Agroecosystems.* 76:39–48. doi:10.1007/s10705-006-9039-5.

Oliveira, A.S., Z.G. Weinberg, I.M. Ogunade, A.A.P.P. Cervantes, K.G. Arriola, Y. Jiang, D. Kim, X. Li, M.C.M.M. Gonçalves, D. Vyas, and A.T. Adesogan. 2017. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:4587–4603. doi:10.3168/jds.2016-11815.

Ortakci, F., J.R. Broadbent, C.J. Oberg, and D.J. McMahon. 2015. Growth and gas production of a novel obligatory heterofermentative Cheddar cheese nonstarter lactobacilli species on ribose and galactose. *J. Dairy Sci.* 98:3645–3654. doi:10.3168/jds.2014-9293.

Palud, A., H. Scornec, J.-F. Cavin, and H. Licandro. 2018. New genes involved in mild stress response identified by transposon mutagenesis in *Lactobacillus paracasei*. *Front. Microbiol.* 9:535. doi:10.3389/fmicb.2018.00535.

Pangallo, D., L. Kraková, A. Puškárová, K. Šoltys, M. Bučková, J. Koreňová, J. Budiš, and T. Kuchta. 2019. Transcription activity of lactic acid bacterial proteolysis-related genes during cheese maturation. *Food Microbiol.* 82:416–425. doi:10.1016/j.fm.2019.03.015.

Papadimitriou, K., Á. Alegría, P.A. Bron, M. de Angelis, M. Gobbetti, M. Kleerebezem, J.A. Lemos, D.M. Linares, P. Ross, C. Stanton, F. Turroni, D. van Sinderen, P. Varmanen, M. Ventura, M. Zúñiga, E. Tsakalidou, and J. Kok. 2016. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80:837–890. doi:10.1128/MMBR.00076-15.

Parks, D.H., G.W. Tyson, P. Hugenholtz, and R.G. Beiko. 2014. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics.* 30:3123–3124. doi:10.1093/bioinformatics/btu494.

- Parte, A.C. 2018. List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
- Pearce, L.E., B.W. Smythe, R.A. Crawford, E. Oakley, S.C. Hathaway, and J.M. Shepherd. 2012. Pasteurization of milk: The heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. *J. Dairy Sci.* 95:20–35. doi:10.3168/jds.2011-4556.
- Peralta, G.H., I. V. Wolf, M.C. Perotti, C. V. Bergamini, and E.R. Hynes. 2016. Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptococci cultures in a cheese extract. *Dairy Sci. Technol.* 96:603–621. doi:10.1007/s13594-016-0291-4.
- Petersen, S.O., S.G. Sommer, F. Béline, C. Burton, J. Dach, J.Y. Dourmad, A. Leip, T. Misselbrook, F. Nicholson, H.D. Poulsen, G. Provolo, P. Sørensen, B. Vinnerås, A. Weiske, M.-P. Bernal, R. Böhm, C. Juhász, and R. Mihelic. 2007. Recycling of livestock manure in a whole-farm perspective. *Livest. Sci.* 112:180–191. doi:10.1016/j.livsci.2007.09.001.
- Pieterse, B., R.J. Leer, F.H.J. Schuren, and M.J. van der Werf. 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology*. 151:3881–3894. doi:10.1099/mic.0.28304-0.
- Pogačić, T., M.-B. Maillard, A. Leclerc, C. Hervé, V. Chuat, A.L. Yee, F. Valence, and A. Thierry. 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol.* 46:145–153. doi:10.1016/j.fm.2014.07.018.
- Pogačić, T., M.-B.B. Maillard, A. Leclerc, C. Hervé, V. Chuat, F. Valence, and A. Thierry. 2016. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatilomes in cheese conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:2335–2346. doi:10.1007/s00253-015-7227-4.
- Pophaly, S.D., R. Singh, S.D. Pophaly, J.K. Kaushik, and S.K. Tomar. 2012. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* 11:114. doi:10.1186/1475-2859-11-114.
- Postollec, F., H. Falentin, S. Pavan, J. Combrisson, and D. Sohier. 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28:848–861.
- Prajapati, J.B., H.P. Zala, N.M. Nathani, M. Sajnani, and C.G. Joshi. 2017. Genome-wide analysis of a potent functional dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* MTCC 5460: A comprehensive study of its dairy niche adaptive features. *Curr. Sci.* 113:2292. doi:10.18520/cs/v113/i12/2292-2297.
- Queiroz, O.C.M., I.M. Ogunade, Z. Weinberg, and A.T. Adesogan. 2018. Silage review: Foodborne pathogens

in silage and their mitigation by silage additives. *J. Dairy Sci.* 101:4132–4142. doi:10.3168/jds.2017-13901.

Quigley, L., O. O'Sullivan, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and P.D. Cotter. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 150:81–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001.

Quigley, L., O. O'Sullivan, C. Stanton, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and P.D. Cotter. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:664–698. doi:10.1111/1574-6976.12030.

R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. doi:<http://www.r-project.org/>.

Rademaker, J.L.W., H. Herbet, M.J.C. Starrenburg, S.M. Naser, D. Gevers, W.J. Kelly, J. Hugenholtz, J. Swings, and J.E.T. van Hylckama Vlieg. 2007. Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)5-PCR fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7128–7137. doi:10.1128/AEM.01017-07.

Ranjit, N.K., C.C. Taylor, and L. Kung Jr. 2002. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass Forage Sci.* 57:73–81. doi:10.1046/j.1365-2494.2002.00304.x.

Rasolofa, E.A., D. St-Gelais, G. LaPointe, and D. Roy. 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int. J. Food Microbiol.* 138:108–118. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.008.

Rea, M.C., C.M.A.P. Franz, W.H. Holzapfel, and T.M. Cogan. 2004. Development of enterococci and production of tyramine during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Irish J. Agric. Food Res.* 43:247–258.

Rehman, S.U., J.M. Banks, E.Y. Brechany, D.D. Muir, P.L.H. McSweeney, and P.F. Fox. 2000. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *Int. Dairy J.* 10:55–65. doi:10.1016/S0958-6946(00)00019-4.

Reich, L.J., and L. Kung. 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:105–109. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.06.002.

Reich, L.J., D.M. Weary, D.M. Veira, and M.A.G. von Keyserlingk. 2010. Effects of sawdust bedding dry matter

on lying behavior of dairy cows: A dose-dependent response. *J. Dairy Sci.* 93:1561–1565.

doi:10.3168/jds.2009-2713.

Renye, J.A., G.A. Somkuti, D.L. Van Hekken, and V.M. Guerrero Prieto. 2011. Short communication:

Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *J. Dairy Sci.* 94:3311–3315.

doi:10.3168/jds.2011-4177.

Rey, M.W., P. Ramaiya, B.A. Nelson, S.D. Brody-Karpin, E.J. Zaretsky, M. Tang, A. de Leon, H. Xiang, V.

Gusti, I.G. Clausen, P.B. Olsen, M.D. Rasmussen, J.T. Andersen, P.L. Jørgensen, T.S. Larsen, A.

Sorokin, A. Bolotin, A. Lapidus, N. Galleron, S.D. Ehrlich, and R.M. Berka. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5:r77. doi:10.1186/gb-2004-5-10-r77.

Ricciardi, A., A. Guidone, R.G. Ianniello, S. Cioffi, M. Aponte, D. Pavlidis, E. Tsakalidou, T. Zotta, and E.

Parente. 2015. A survey of non-starter lactic acid bacteria in traditional cheeses: Culture dependent identification and survival to simulated gastrointestinal transit. *Int. Dairy J.* 43:42–50.

doi:10.1016/j.idairyj.2014.11.006.

Ricciardi, A., E. Parente, A. Guidone, R. Ianniello, T. Zotta, S. Sayem, and M. Varcamonti. 2012. Genotypic

diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplanitarum* and *Lactobacillus pentosus*. *Int. J. Food Microbiol.* 157:278–285. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.018.

Rossi, F., and F. Dellaglio. 2007. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of

microbial indicators. *J. Appl. Microbiol.* 103:1707–1715. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03416.x.

Rowbotham, R., and P. Ruegg. 2016. Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and

recycled manure solids used as bedding in freestalls. *J. Dairy Sci.* 99:6594–6608. doi:10.3168/jds.2015-10674.

Rowbotham, R.F., and P.L. Ruegg. 2015. Association of bedding types with management practices and

indicators of milk quality on larger Wisconsin dairy farms. *J. Dairy Sci.* 98:7865–7885.

doi:10.3168/jds.2015-9866.

Ruiz, P., S. Seseña, M. Llanos Palop, and M.L. Palop. 2014. A comparative study of different PCR-based DNA

fingerprinting techniques for typing of lactic acid bacteria. *Eur. Food Res. Technol.* 239:87–98.

doi:10.1007/s00217-014-2197-9.

- Sádecká, J., N. Šaková, D. Pangallo, J. Koreňová, E. Kolek, A. Puškárová, M. Bučková, L. Valík, and T. Kuchta. 2016. Microbial diversity and volatile odour-active compounds of barrelled ewes' cheese as an intermediate product that determines the quality of winter bryndza cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 70:237–244. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.048.
- Saini, K., S.K. Tomar, V. Sangwan, and B. Bhushan. 2014. Evaluation of lactobacilli from human sources for uptake and accumulation of selenium. *Biol. Trace Elem. Res.* 160:433–436. doi:10.1007/s12011-014-0065-x.
- Salvetti, E., S. Torriani, and G.E. Felis. 2012. The genus *Lactobacillus*: A taxonomic update. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 4:217–226. doi:10.1007/s12602-012-9117-8.
- Sanders, J.W., G. Venema, and J. Kok. 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:483–501. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00409.x.
- Santos, É.B.S., C.A. Conte Júnior, E.T. Márscico, R.M. Franco, V. da S. Gomes, B.B. Rosa, S.P.S. Mantilla, F.A.A. Calixto, and A.C. de O. Silva. 2017. Potential biogenic amine-producing bacteria in ripened cheeses. *Rev. Bras. Ciência Veterinária.* 24:207–215. doi:10.4322/rbcv.2017.039.
- Savard, P., B. Lamarche, M.-E. Paradis, H. Thiboutot, É. Laurin, and D. Roy. 2011. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.* 149:50–57. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.026.
- Savijoki, K., H. Ingmer, and P. Varmanen. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394–406. doi:10.1007/s00253-006-0427-1.
- Schmidt, R.J., and L. Kung. 2010. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. *J. Dairy Sci.* 93:1616–1624. doi:10.3168/jds.2009-2555.
- Séboussi, R., G.F. Tremblay, V. Ouellet, P.Y. Chouinard, Y. Chorfi, G. Bélanger, and É. Charbonneau. 2016. Selenium-fertilized forage as a way to supplement lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:5358–5369. doi:10.3168/jds.2015-10758.
- Shahbal, S., D. Hemme, and M. Desmazeaud. 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait.* 71:351–357. doi:10.1051/lait:1991327.

- Singh, S., P. Goswami, R. Singh, and K.J. Heller. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT-Food Sci. Technol.* 42:448–457.
- Singh, T.K., M.A. Drake, and K.R. Cadwallader. 2003. Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2:166–189. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x.
- Skeie, S.B., M. Håland, I.M. Thorsen, J. Narvhus, and D. Porcellato. 2019. Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *J. Dairy Sci.* 102:1959–1971. doi:10.3168/jds.2017-14083.
- Smid, E.J., O. Erkus, M. Spus, J.C. Wolkers-Rooijackers, S. Alexeeva, and M. Kleerebezem. 2014. Functional implications of the microbial community structure of undefined mesophilic starter cultures. *Microb. Cell Fact.* 13:S2. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S2.
- Smit, G., B.A. Smit, and W.J.M. Engels. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:591–610. doi:10.1016/j.fmrre.2005.04.002.
- Smith, M.M., C.L. Simms, and J.D. Aber. 2017. Case Study: Animal bedding cost and somatic cell count across New England dairy farms: Relationship with bedding material, housing type, herd size, and management system. *Prof. Anim. Sci.* 33:616–626. doi:10.15232/PAS.2016-01601.
- Sohier, D., E. Jamet, A.-S. Le Dizes, M. Dizin, S. Pavan, F. Postollec, and E. Coton. 2012. Polyphasic approach for quantitative analysis of obligately heterofermentative *Lactobacillus* species in cheese. *Food Microbiol.* 31:271–277. doi:10.1016/j.fm.2012.01.009.
- Sorter, D.E., H.J. Kester, and J.S. Hogan. 2014. Short communication: Bacterial counts in recycled manure solids bedding replaced daily or deep packed in freestalls. *J. Dairy Sci.* 97:2965–2968. doi:10.3168/jds.2013-7814.
- Stefanovic, E., G. Fitzgerald, and O. McAuliffe. 2017a. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiol.* 61:33–49. doi:10.1016/j.fm.2016.08.009.
- Stefanovic, E., K.N. Kilcawley, M.C. Rea, G.F. Fitzgerald, and O. McAuliffe. 2017b. Genetic, enzymatic and metabolite profiling of the *Lactobacillus casei* group reveals strain biodiversity and potential applications for flavour diversification. *J. Appl. Microbiol.* 122:1245–1261. doi:10.1111/jam.13420.
- Stefanovic, E., K.N. Kilcawley, C. Roces, M.C. Rea, M. O'Sullivan, J.J. Sheehan, and O. McAuliffe. 2018.

Evaluation of the potential of *Lactobacillus paracasei* adjuncts for flavor compounds development and diversification in short-aged Cheddar cheese. *Front. Microbiol.* 9:1506. doi:10.3389/fmicb.2018.01506.

Stefanovic, E., and O. McAuliffe. 2018. Comparative genomic and metabolic analysis of three *Lactobacillus paracasei* cheese isolates reveals considerable genomic differences in strains from the same niche. *BMC Genomics.* 19:205. doi:10.1186/s12864-018-4586-0.

Stefanovic, E., A. Thierry, M.-B. Maillard, A. Bertuzzi, M.C. Rea, G. Fitzgerald, O. McAuliffe, and K.N. Kilcawley. 2017c. Strains of the *Lactobacillus casei* group show diverse abilities for the production of flavor compounds in 2 model systems. *J. Dairy Sci.* 100:6918–6929. doi:10.3168/jds.2016-12408.

Stellato, G., F. De Filippis, A. La Storia, and D. Ercolini. 2015. Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7893–7904. doi:10.1128/AEM.02294-15.

Stevenson, D.M., R.E. Muck, K.J. Shinners, and P.J. Weimer. 2006. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:329–338. doi:10.1007/s00253-005-0170-z.

Tabacco, E., S. Piano, L. Cavallarin, T.F. Bernardes, and G. Borreani. 2009. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *J. Appl. Microbiol.* 107:1632–1641. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04344.x.

Tabacco, E., S. Piano, A. Revello-Chion, and G. Borreani. 2011. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94:5589–5598. doi:10.3168/jds.2011-4286.

Taïbi, A., N. Dabour, M. Lamoureux, D. Roy, and G. LaPointe. 2011. Comparative transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains under conditions simulating Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 146:263–275. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.034.

te Giffel, M.C., A. Wagendorp, A. Herrewegh, and F. Driehuis. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81:625–630. doi:10.1023/A:1020578110353.

Teles Santos, T., R.M. Santos Ornellas, L. Borges Arcucio, M. Messias Oliveira, J.R. Nicoli, C. Villela Dias,

- A.P. Trovatti Uetanabaro, and G. Vinderola. 2016. Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. *LWT - Food Sci. Technol.* 73:259–266. doi:10.1016/j.lwt.2016.06.003.
- Tilocca, B., N. Costanzo, V.M. Morittu, A.A. Spina, A. Soggiu, D. Britti, P. Roncada, and C. Piras. 2020. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J. Proteomics.* 210:103534. doi:10.1016/j.jprot.2019.103534.
- Torriani, S., G.E. Felis, and F. Dellaglio. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplanitarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3450–3454. doi:10.1128/AEM.67.8.3450-3454.2001.
- Ubeda, C., R.M. Callejón, A.M. Troncoso, J.M. Moreno-Rojas, F. Peña, and M.L. Morales. 2012. Characterization of odour active compounds in strawberry vinegars. *Flavour Fragr. J.* 27:313–321. doi:10.1002/ffj.3103.
- Vacheyrou, M., A.-C. Normand, P. Guyot, C. Cassagne, R. Piarroux, and Y. Bouton. 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146:253–262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033.
- Valerio, F., P. Lavermicocca, M. Pascale, and A. Visconti. 2004. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 233:289–295. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09494.x.
- Venegas-Ortega, M.G., A.C. Flores-Gallegos, J.L. Martínez-Hernández, C.N. Aguilar, and G. V. Nevárez-Moorillón. 2019. Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: a sustainable approach for healthier foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18:1039–1051. doi:10.1111/1541-4337.12455.
- Wang, J., X. Fang, T. Wu, W. Min, and Z. Yang. 2018. Exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 as adjunct culture in Cheddar cheese production. *LWT*. 97:419–426. doi:10.1016/j.lwt.2018.07.011.
- Wasfi, R., G.R. Abdellatif, H.M. Elshishtawy, and H.M. Ashour. 2020. First-time characterization of viable but non-culturable *Proteus mirabilis*: Induction and resuscitation. *J. Cell. Mol. Med.* 24:2791–2801. doi:10.1111/jcmm.15031.
- Weber, M., J. Geißert, M. Kruse, and A. Lipski. 2014. Comparative analysis of bacterial community

- composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *J. Dairy Sci.* 97:6761–6776. doi:10.3168/jds.2014-8340.
- Wendt, C., B. Wiesenthal, E. Dietz, and H. Rüden. 1998. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J. Clin. Microbiol.* 36:3734–3736.
- Wilkinson, J.M., and D.R. Davies. 2013. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass Forage Sci.* 68:1–19. doi:10.1111/j.1365-2494.2012.00891.x.
- Wolfe, T., E. Vasseur, T.J. DeVries, and R. Bergeron. 2018. Effects of alternative deep bedding options on dairy cow preference, lying behavior, cleanliness, and teat end contamination. *J. Dairy Sci.* 101:530–536. doi:10.3168/jds.2016-12358.
- Wu, C., J. Huang, and R. Zhou. 2017. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. *Crit. Rev. Microbiol.* 43:393–404. doi:10.1080/1040841X.2016.1179623.
- Yanachkina, P., I. Doolan, G. LaPointe, and M.G. Wilkinson. 2020. Matching starter phenotype to functionality for low salt Cheddar cheese production based on viability, permeability, autolysis, enzyme accessibility and release in model systems. *Int. Dairy J.* 105:104682. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104682.
- Yang, L., X. Yuan, J. Li, Z. Dong, and T. Shao. 2019. Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant. *Bioresour. Technol.* 275:280–287. doi:10.1016/j.biortech.2018.12.067.
- Yee, A.L., M.-B. Maillard, N. Roland, V. Chuat, A. Leclerc, T. Pogačić, F. Valence, and A. Thierry. 2014. Great interspecies and intraspecies diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 191:60–68. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.001.
- Yitbarek, M.B., and B. Tamir. 2014. Silage Additives: Review. *Open J. Appl. Sci.* 4:258–274. doi:10.4236/ojapps.2014.45026.
- Yunita, D., and C.E.R. Dodd. 2018. Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom. *J. Dairy Sci.* 101:4923–4935. doi:10.3168/jds.2017-14104.
- Zdanowicz, M., J.A. Shelford, C.B. Tucker, D.M. Weary, and M.A.G. von Keyserlingk. 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *J. Dairy Sci.* 87:1694–1701. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73322-6.

- Zheng, J., S. Wittouck, E. Salvetti, C.M.A.P. Franz, H.M.B. Harris, P. Mattarelli, P.W. O'Toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G.E. Felis, M.G. Gänzle, and S. Lebeer. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70:2782–2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107.
- Zhou, Y., P. Drouin, and C. Lafrenière. 2016. Effect of temperature (5–25°C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 121:657–671. doi:10.1111/jam.13198.

## Annexe A – Matériel supplémentaire du chapitre 2

**Table A1.** Steps for identification of *Lactobacillus plantarum* group by recA multiplex PCR.

Step	Temperature	Time
Initial Denaturation	94°C	3 min
Denaturation	94°C	30 s
Primer Annealing	56°C	10 s
Extension	72°C	30 s
Final Extension	72°C	5 min

**Table A2.** recA Multiplex PCR conditions for identification of *Lactobacillus plantarum* group.

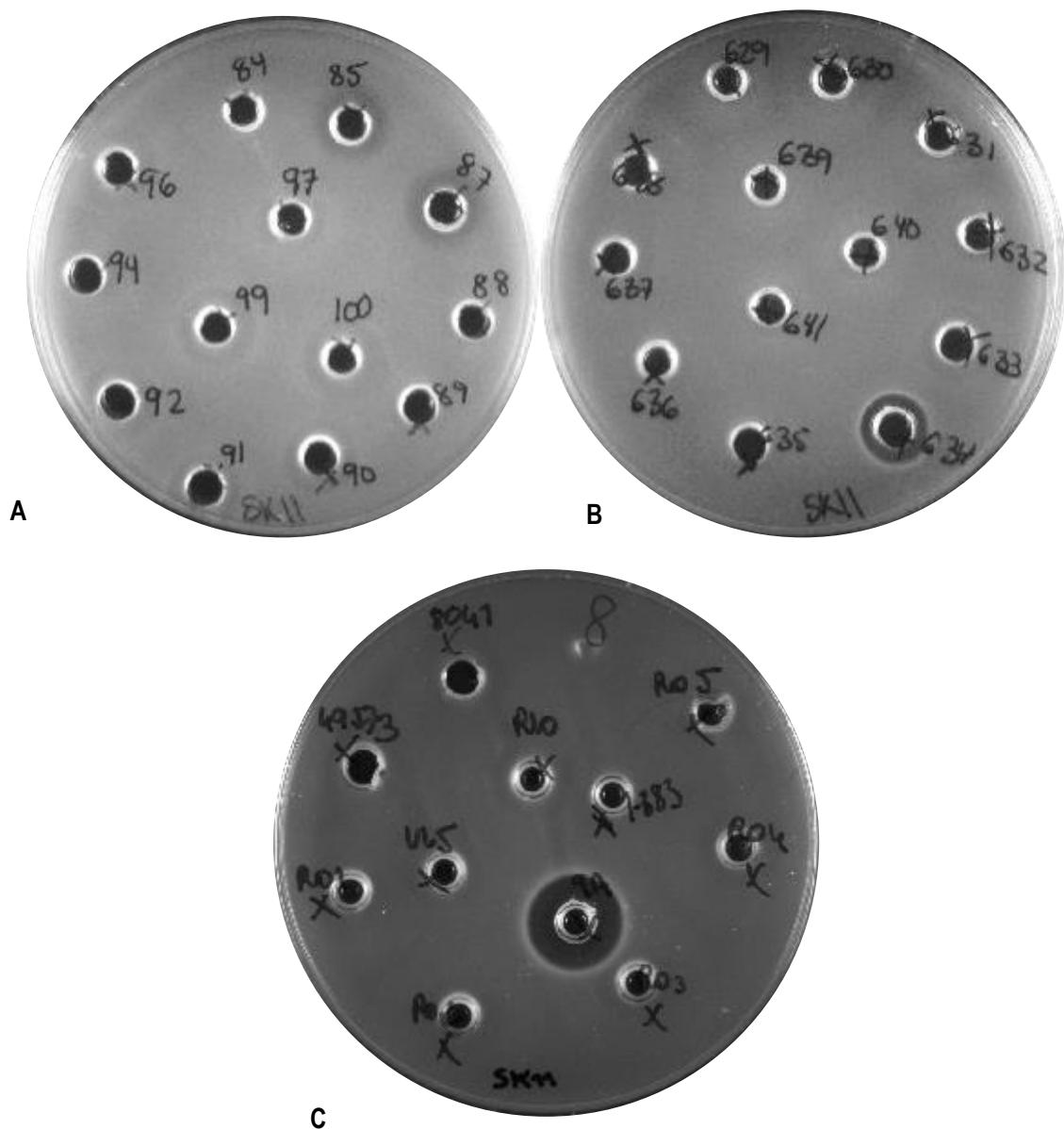
Product	Volume (µL)	Final concentration
Nuclease-free water	32.7	
10 x PCR Buffer	3.75	1.53 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs mix	1	200 µM
paraF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3')	2.5	0.5 µM
pentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3')	2.5	0.5 µM
planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3')	1.2	0.24 µM
pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3')	2.5	0.5 µM
DNA polymerase	0.25	1.25 U
DNA	1	0.5 ng/µL

**Table A3.** Steps for RAPD typing

Step	Temperature	Time
Initial Denaturation	94°C	5 min
Denaturation	94°C	40 s
Primer Annealing	45°C	60 s
Extension	72°C	60 s
Denaturation	94°C	30 s
Primer Annealing	55°C	60 s
Extension	72°C	3 min
Final Extension	70°C	5 min

**Table A4.** RAPD typing PCR conditions

Product	Volume (µL)	Final concentration
Nuclease-free water	38.75	
10 x PCR Buffer	5	2 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs mix	1	200 µM
M13 primer	5	1 µM
DNA polymerase	0.25	1.25 U
DNA	1	0.5 ng/µL



**Figure A1.** Agar diffusion assay with the indicator strain *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11. A) Culture supernatants of *Lactobacillus fermentum* RKG 1-85 and RKG 1-87 have inhibitory activity that can be caused by organic acids. B) Culture supernatant of *Lactobacillus plantarum* RKG 1-634 have bacteriocin-like inhibitory activity. C) Culture supernatant of *L. lactis* ATCC 11454 producing nisin A (identified as 9A).

**Table A5.** Dry matter content and pH of forages

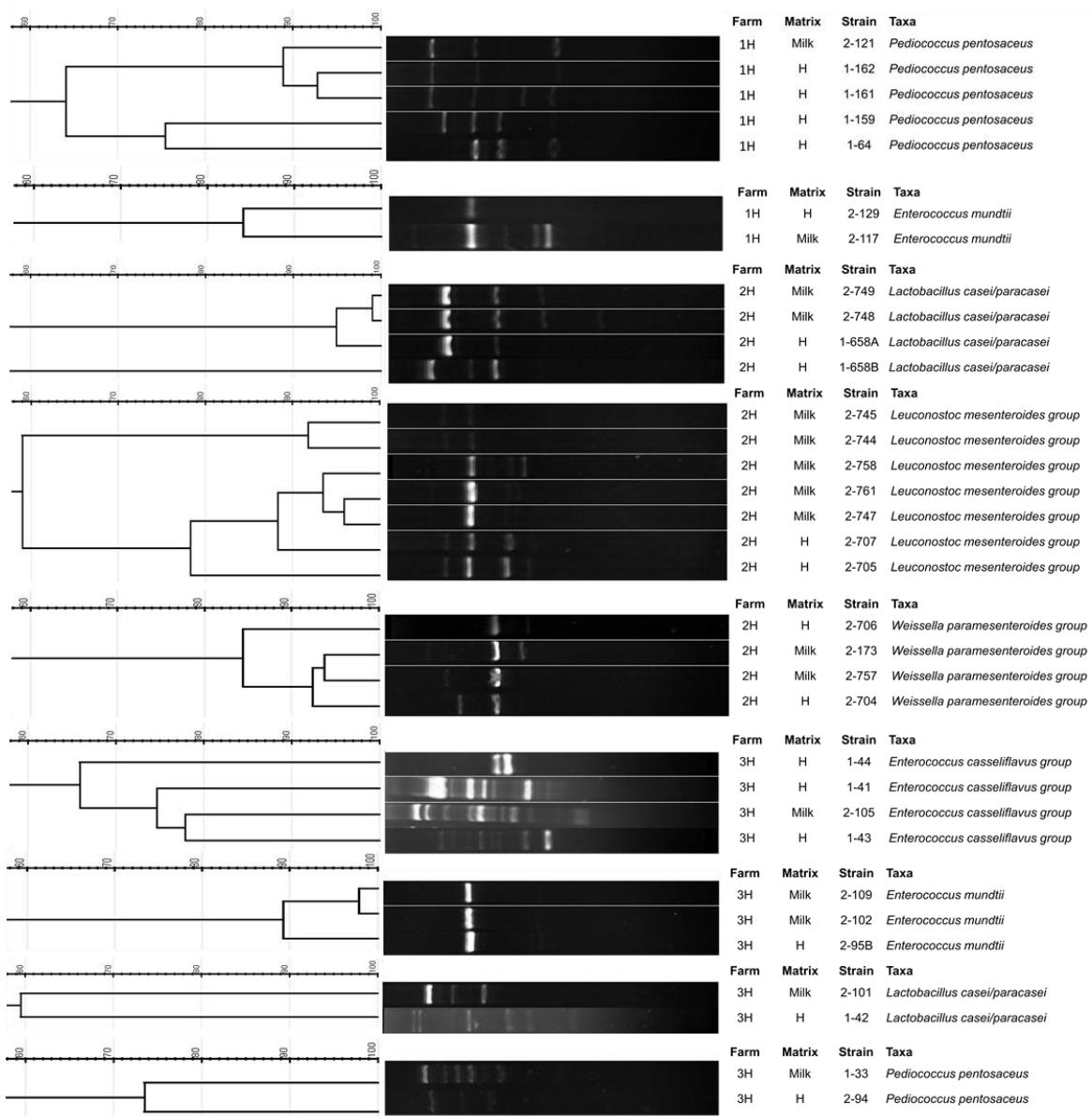
Forage <sup>1</sup>	H	GL	GLI	C	CI
DM (%) <sup>2</sup>	87.28 ± 0.95 <sup>A</sup>	46.07 ± 1.63 <sup>B</sup>	40.98 ± 1.42 <sup>BC</sup>	33.66 ± 2.15 <sup>D</sup>	38.07 ± 0.52 <sup>DC</sup>
pH <sup>2</sup>	NA	4.55 ± 0.06 <sup>A</sup>	4.43 ± 0.06 <sup>A</sup>	3.83 ± 0.04 <sup>B</sup>	3.83 ± 0.11 <sup>B</sup>

<sup>1</sup>H = Hay; GL = Grass or legume silage; C = Corn silage; GLI = Grass or legume silage, inoculated; CI = Corn silage, inoculated; INO = Commercial inoculant.

<sup>2</sup>Results were expressed as means ± standard error. Distinct characters in superscript in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Table A6.** Percentage of isolates not identified as lactic acid bacteria (LAB) for two culture media: ABEV agar (arginine, bromocresol purple, beef extract and vancomycin agar) and MRS with bromophenol blue agar (MRS-BPB). They belonged to *Acetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., cyanobacteria, enterobacteria, *Escherichia coli*, *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Kocuria* spp., *Raoultella* spp., and *Staphylococcus* spp.

Hay		Grass or legume silage		Corn silage		Milk	
ABEV	MRS-BPB	ABEV	MRS-BPB	ABEV	MRS-BPB	ABEV	MRS-BPB
4.8%	35.5%	0%	2.3%	0%	4.1%	1.9%	21.8%



**Figure A2. (to be continued)**

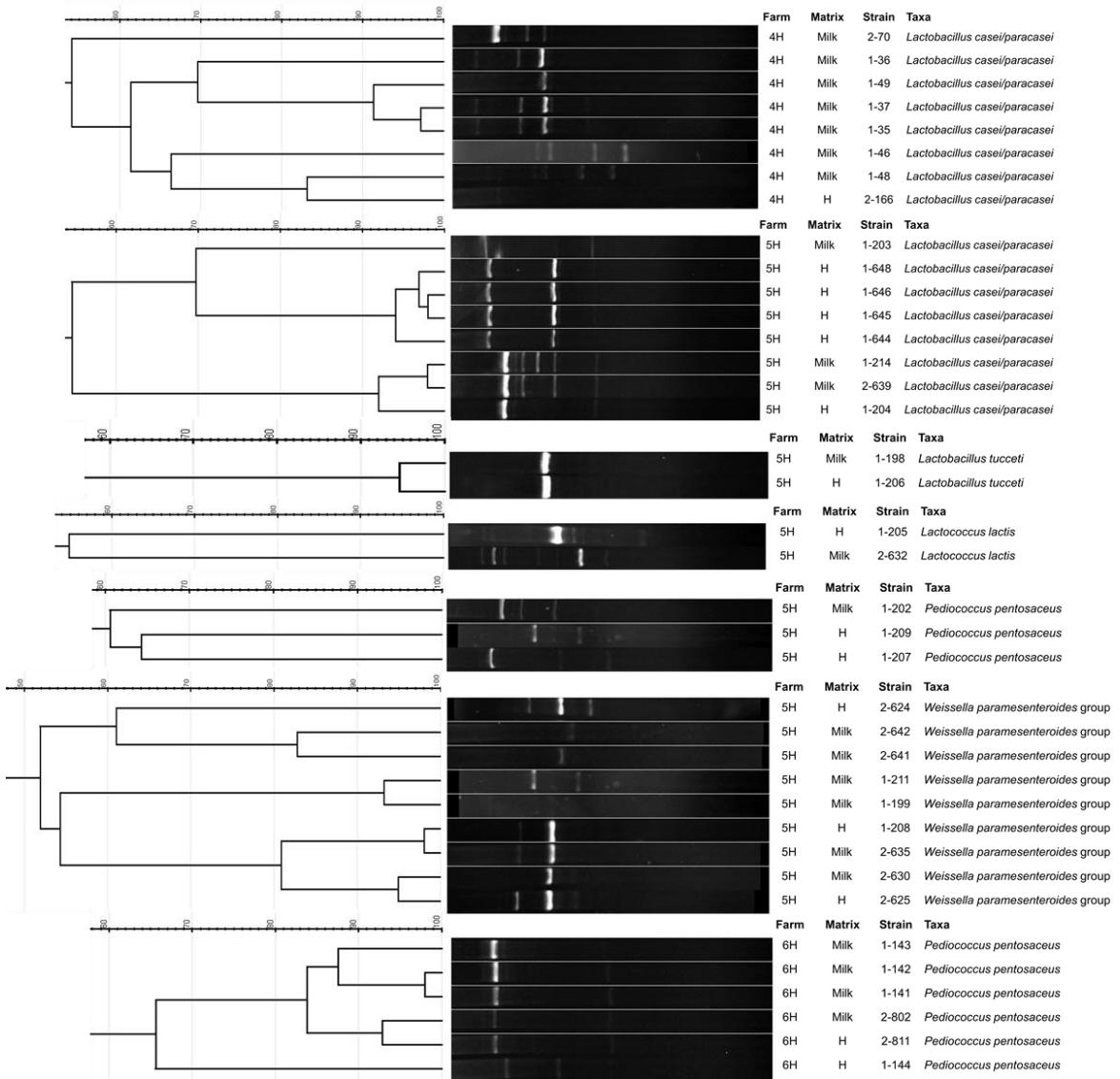
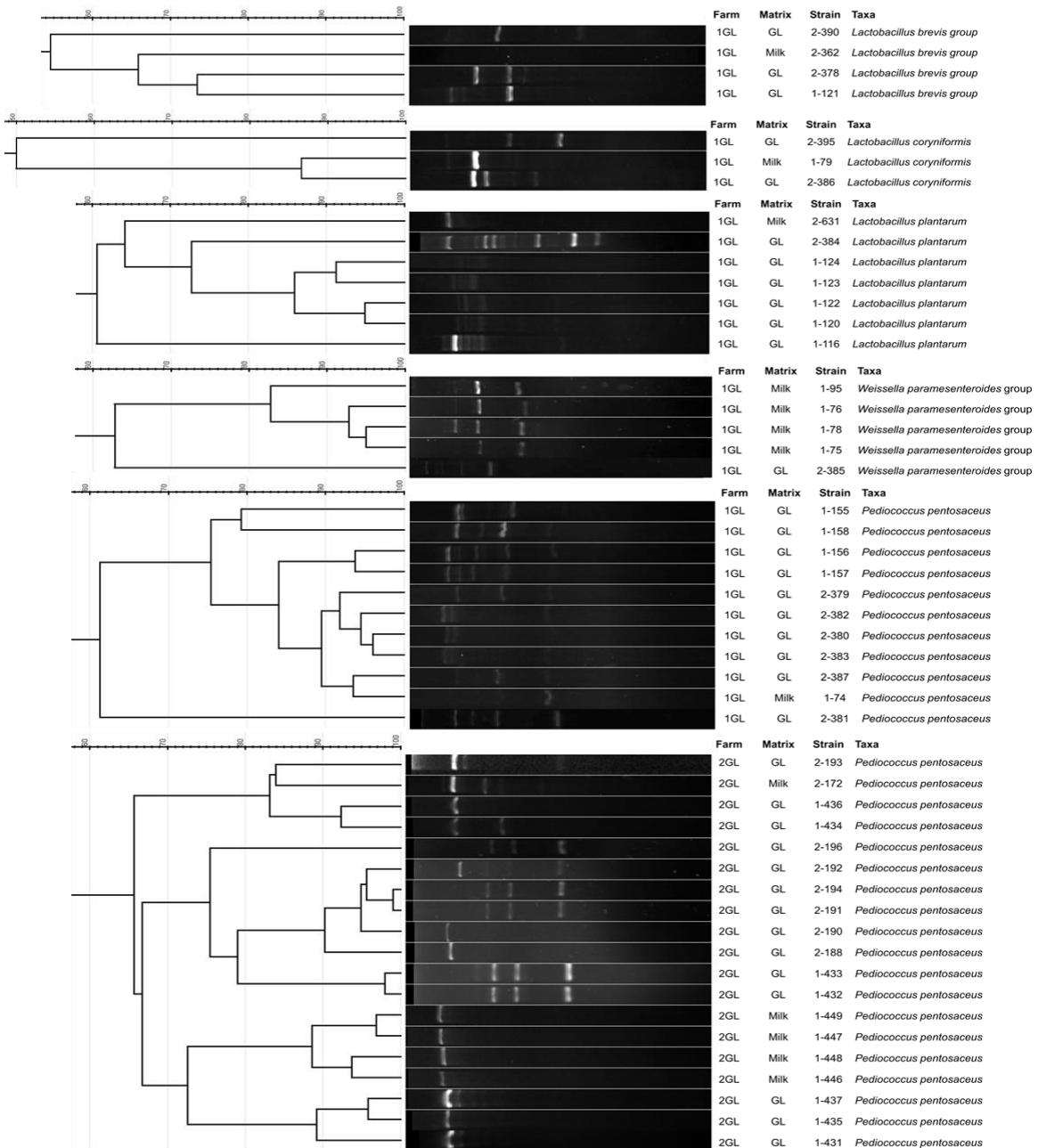
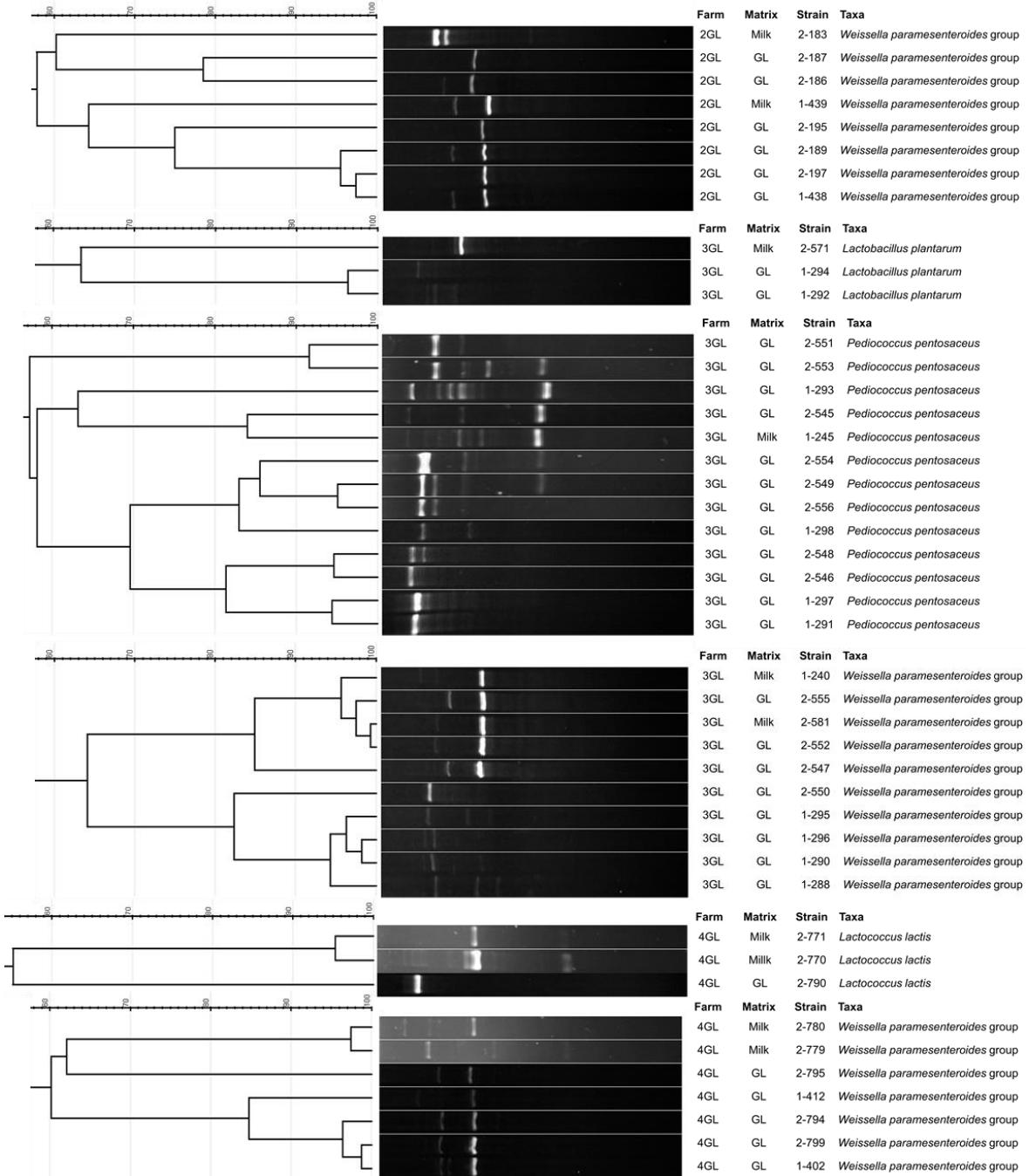


Figure A2. (to be continued)



**Figure A2. (to be continued)**



**Figure A2. (to be continued)**

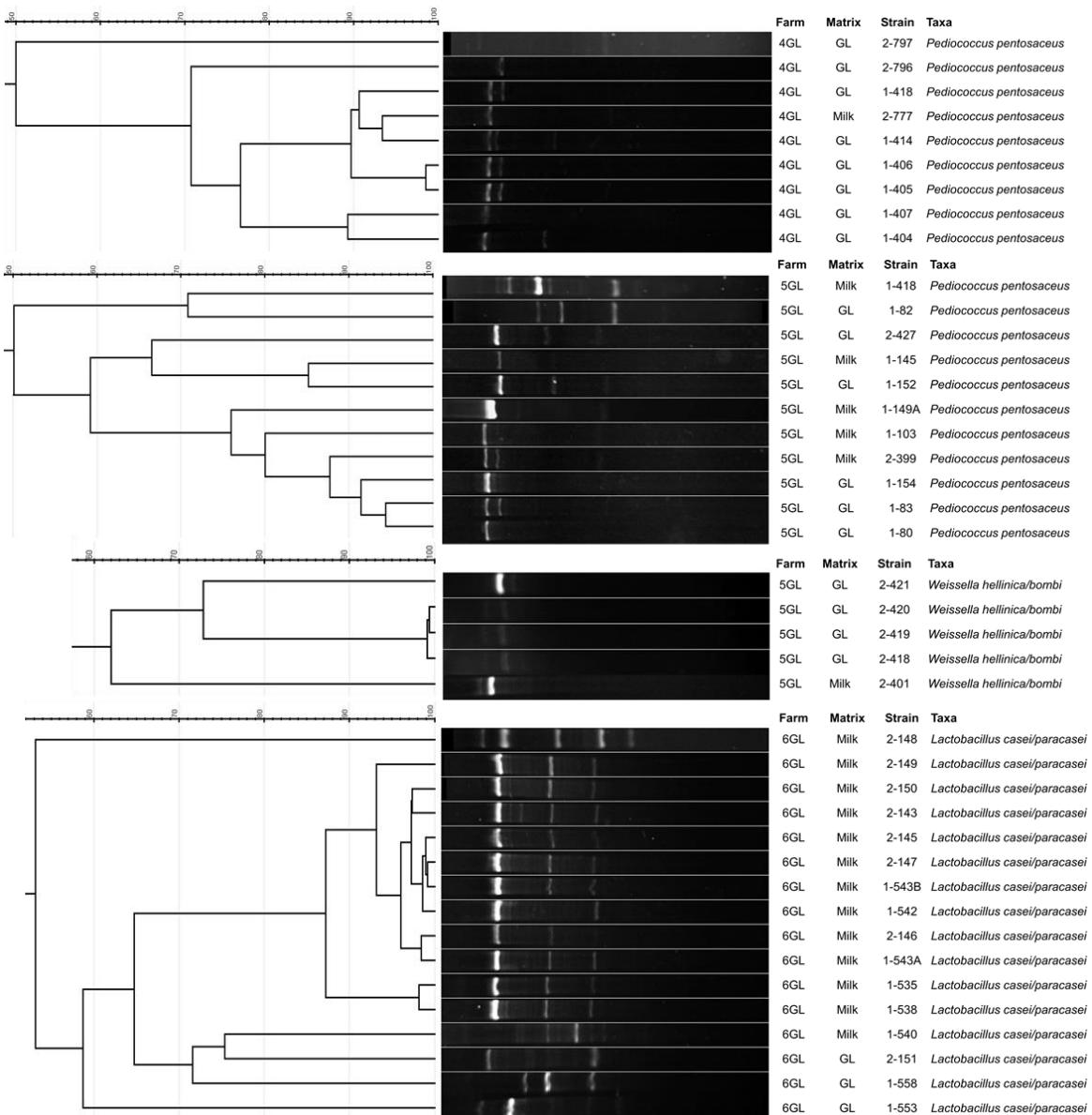


Figure A2. (to be continued)

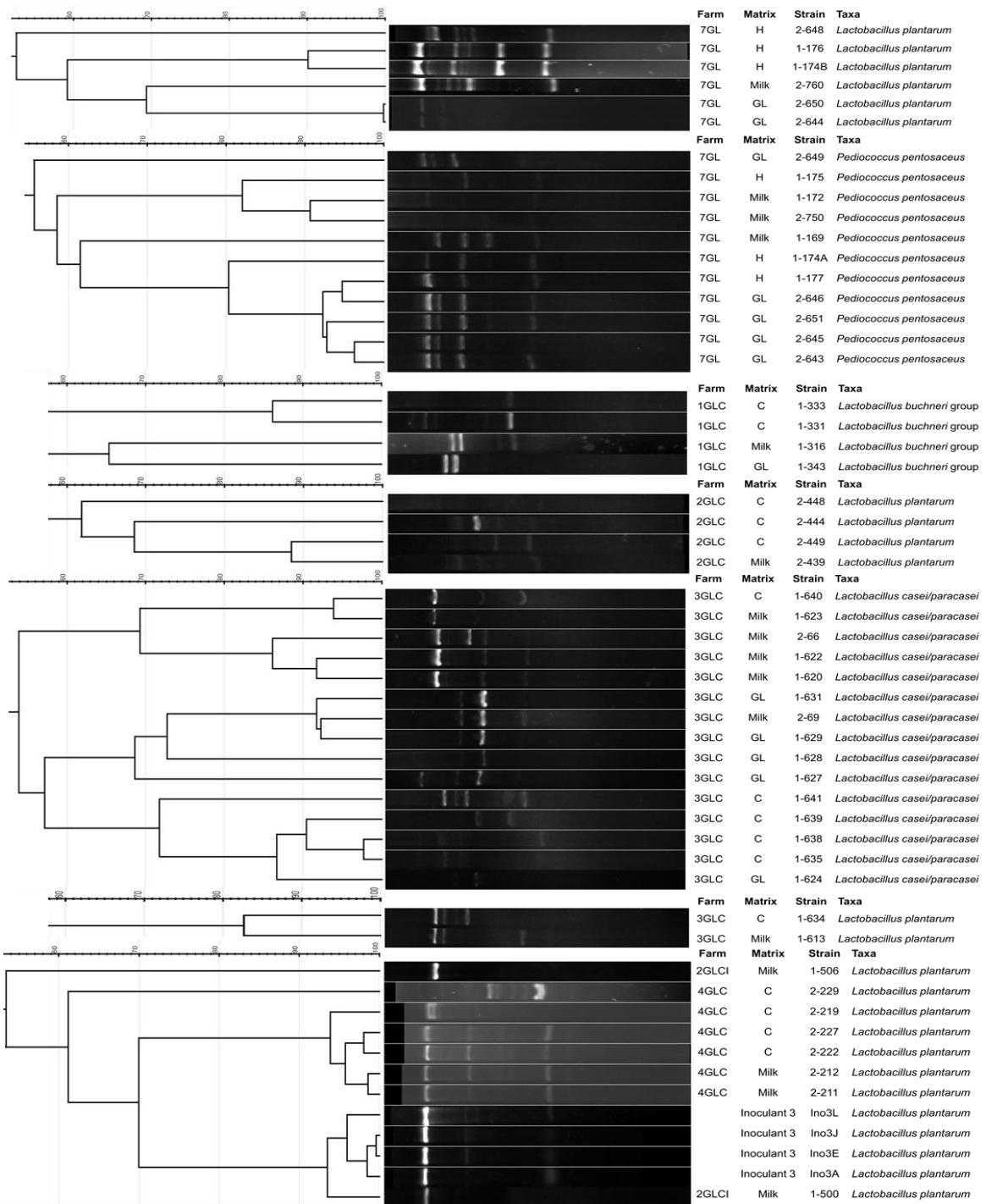
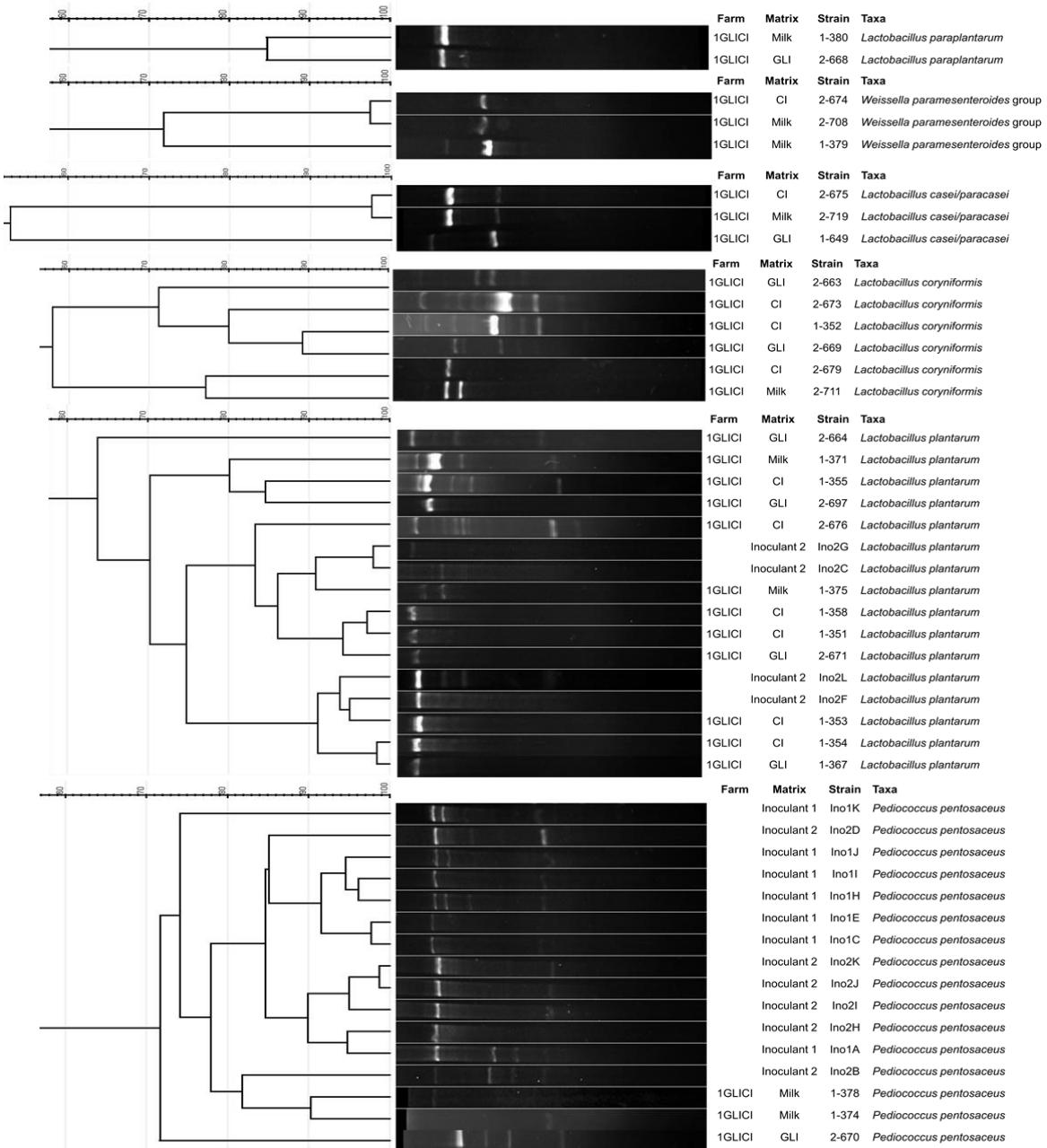


Figure A2. (to be continued)



**Figure A2. (to be continued)**

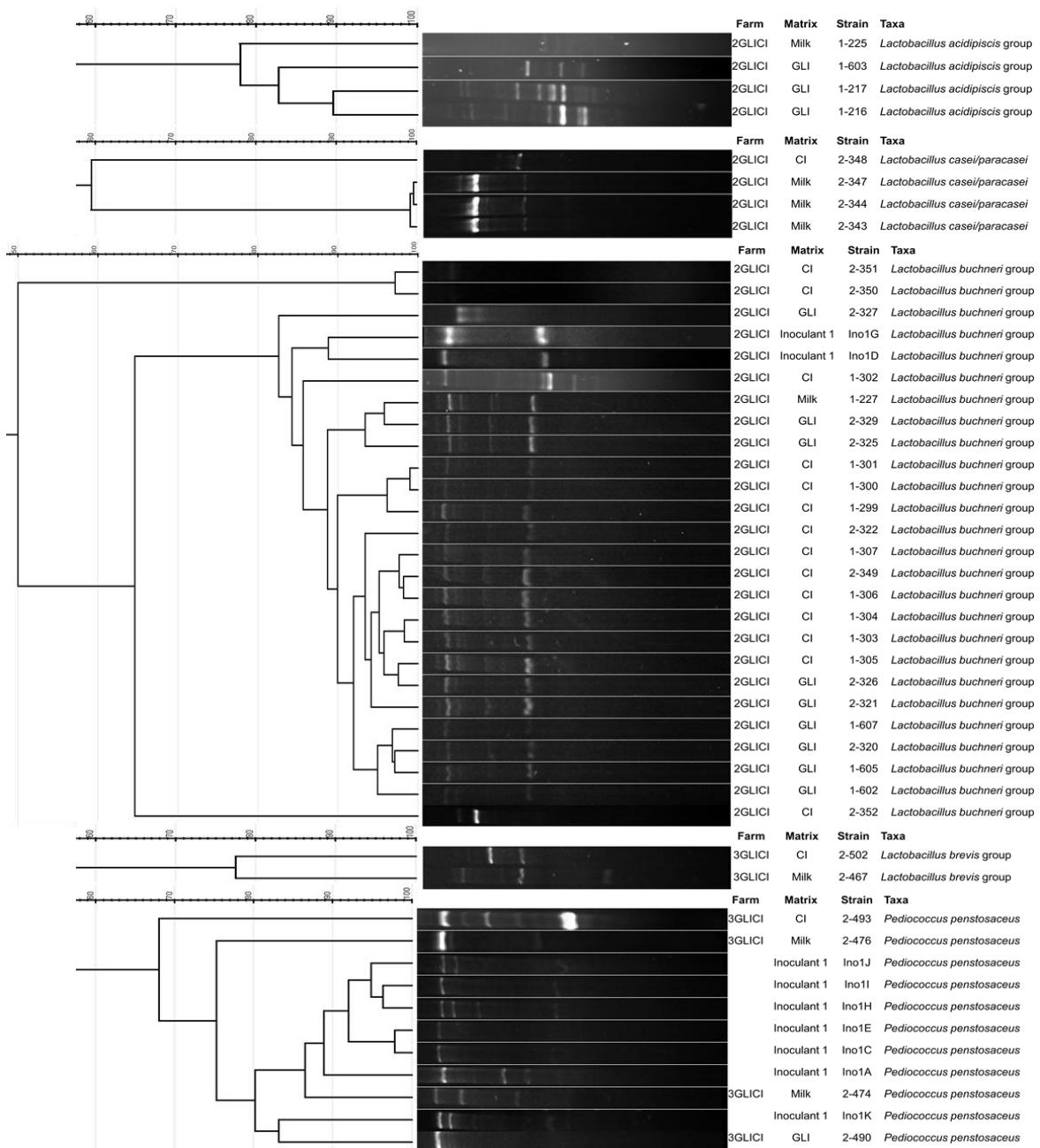
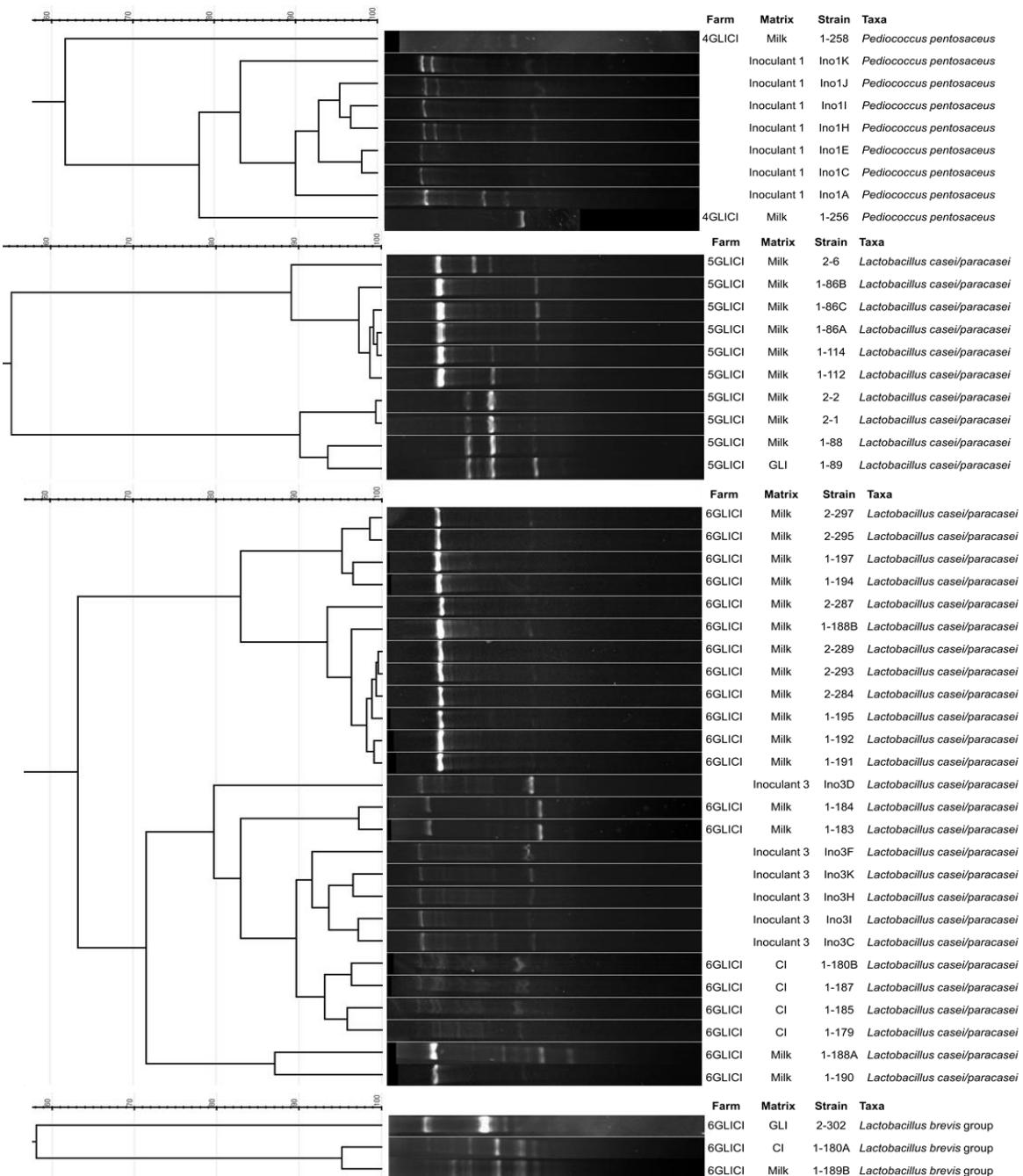
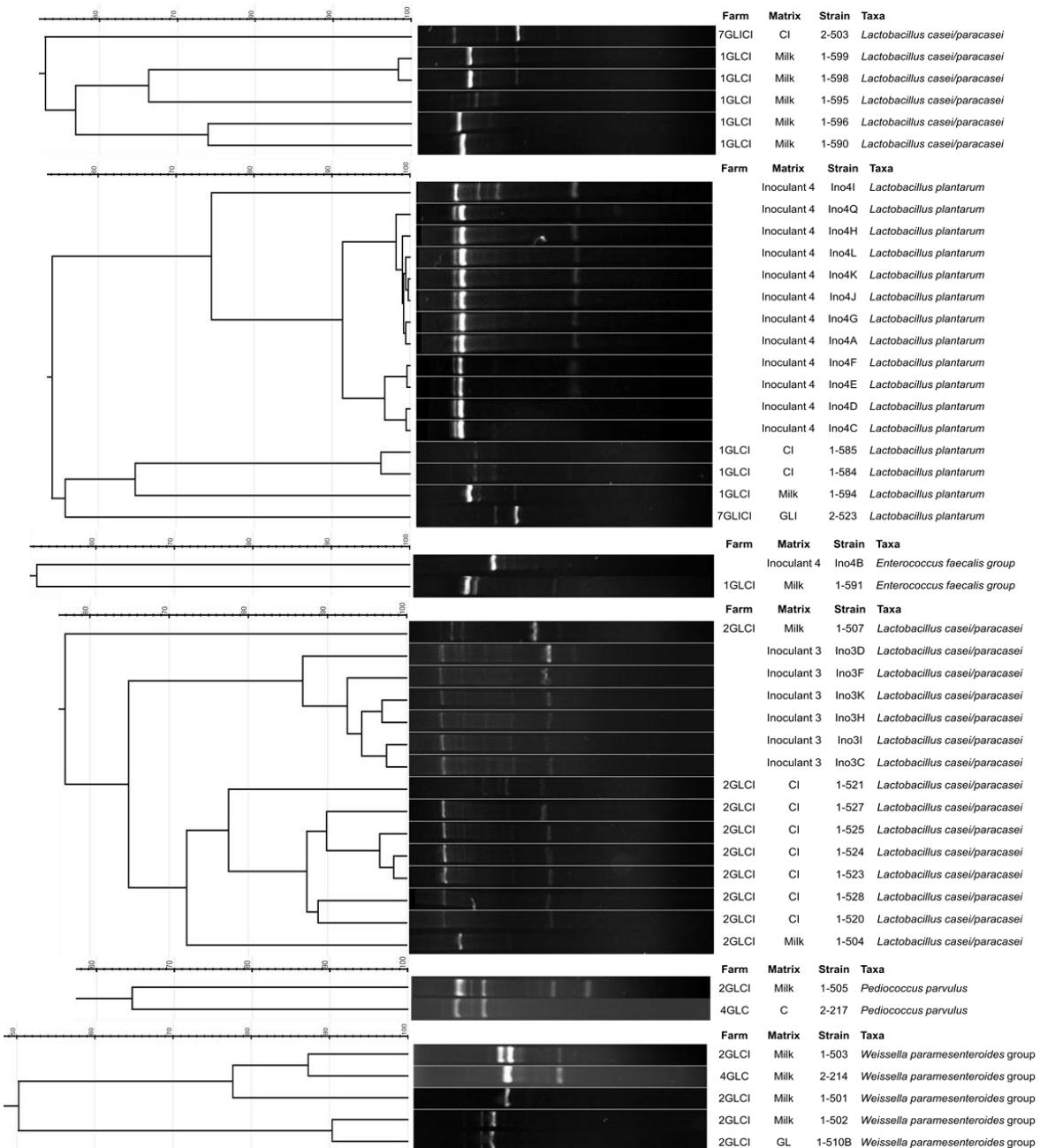


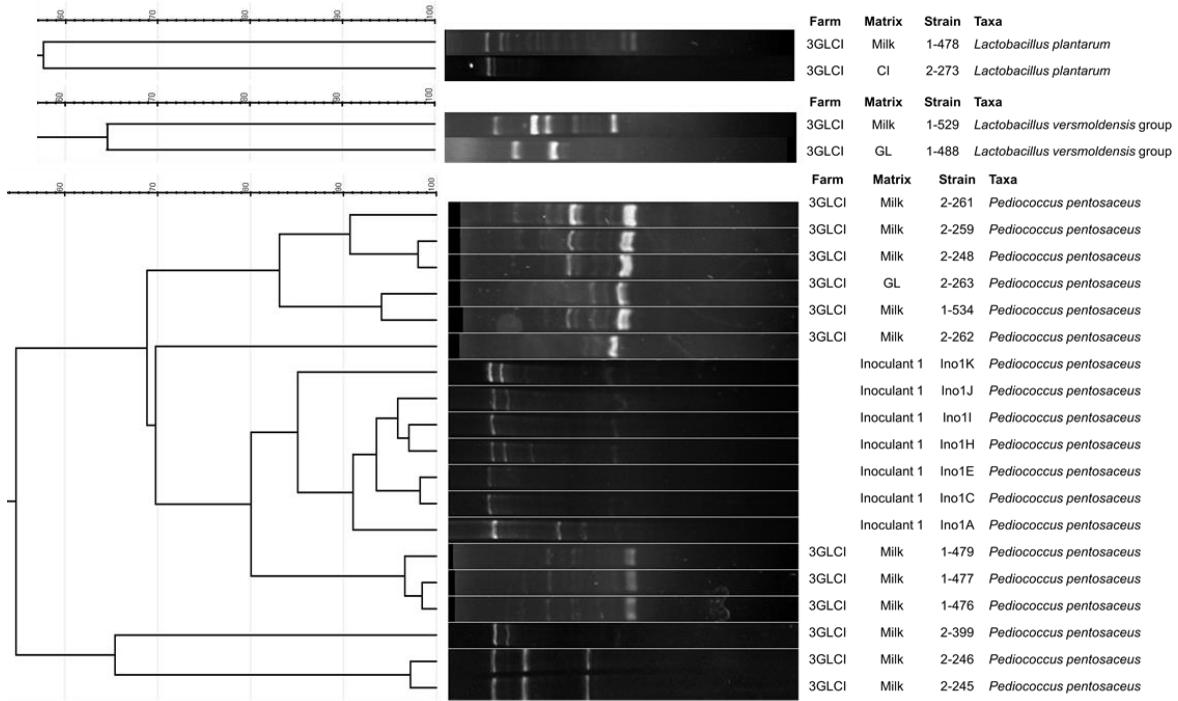
Figure A2. (to be continued)



**Figure A2. (to be continued)**

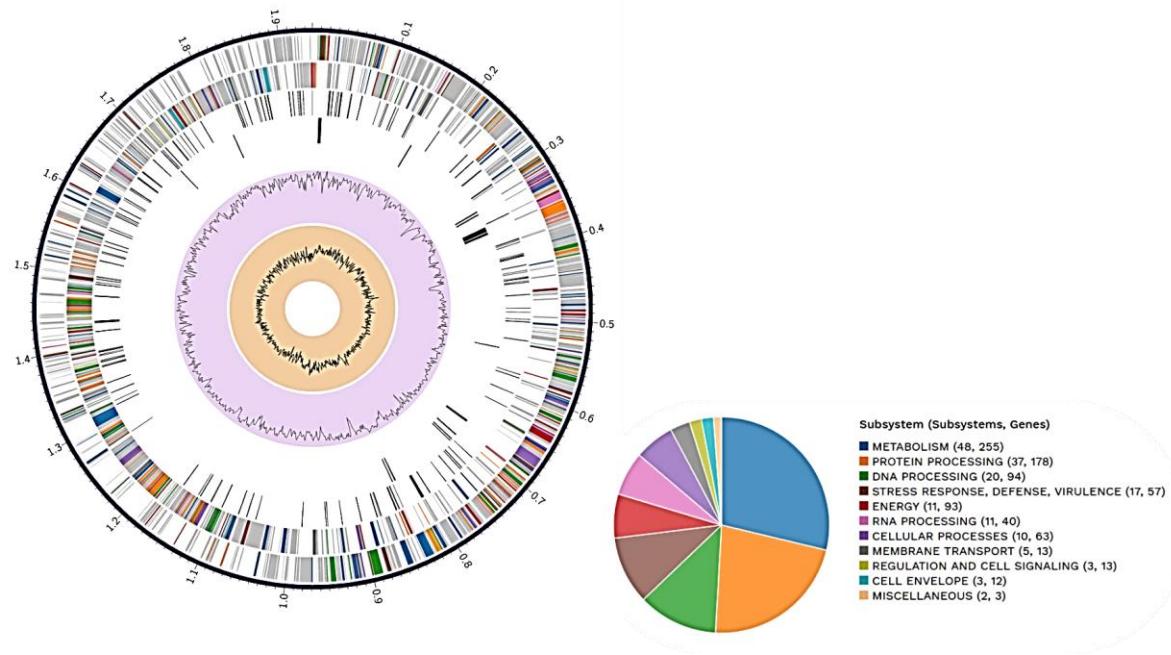


**Figure A2. (to be continued)**

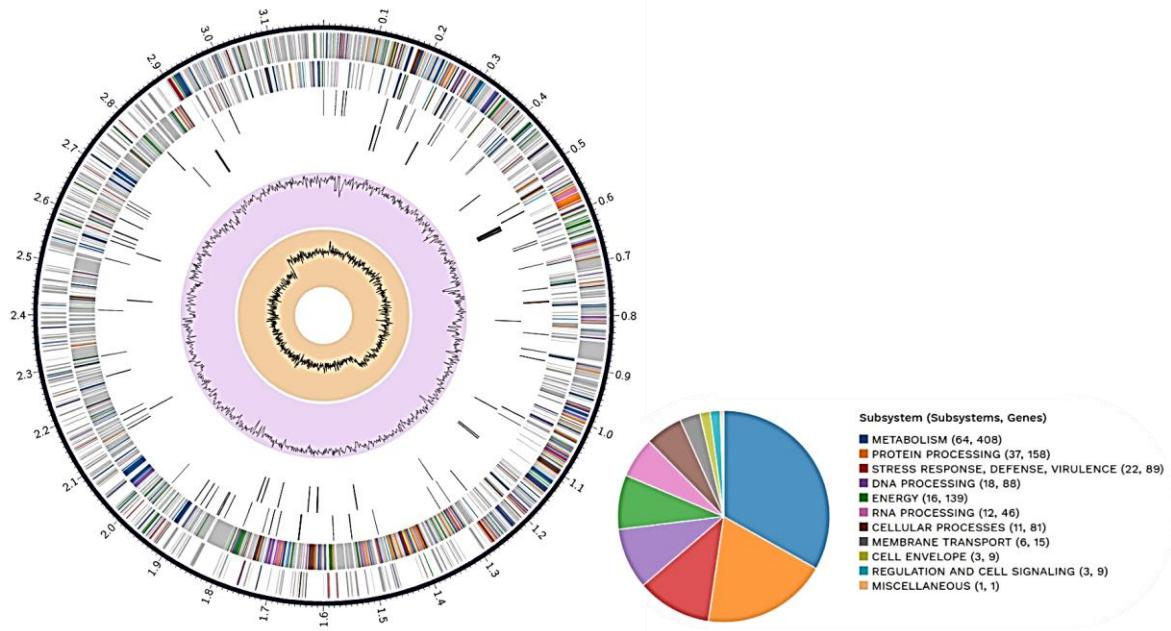


**Figure A2.** Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) clusters of lactic acid bacteria in milk that could originate from silage isolates. Similarity percentages between band patterns of the isolates obtained by Random Amplification of Polymorphic DNA and determined by Pearson's Correlation Coefficient. Inoculant 1 = Biotal Buchneri 500, and Inoculant 2 = Biotal Supersile (Lallemand Animal Nutrition, Milwaukee, WI); Inoculant 3 = 11CFT, Inoculant 4 = 11C33, and Ino5 = 11G22 (Pioneer, Johnston, IA).

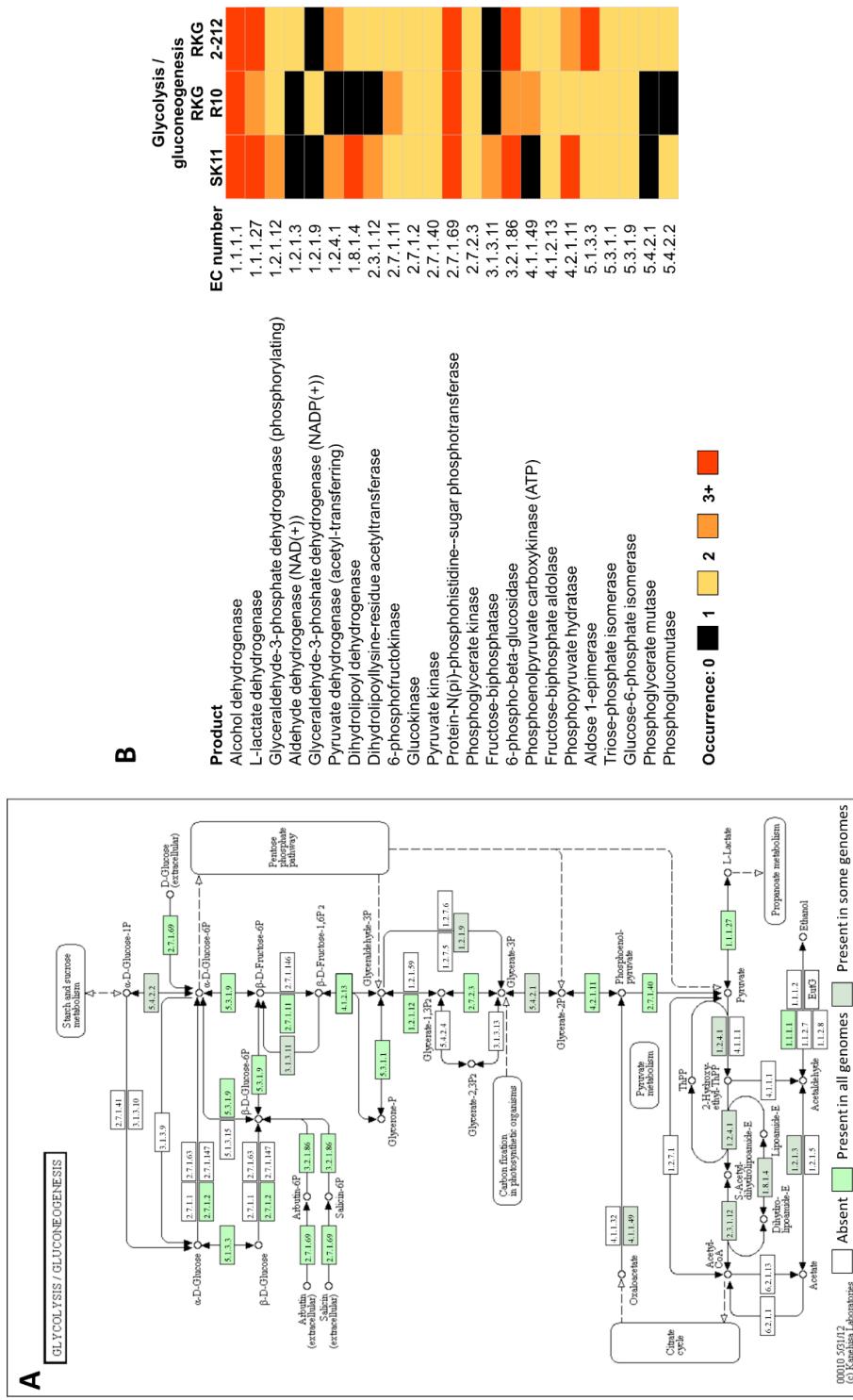
## Annexe B – Matériel supplémentaire du chapitre 3



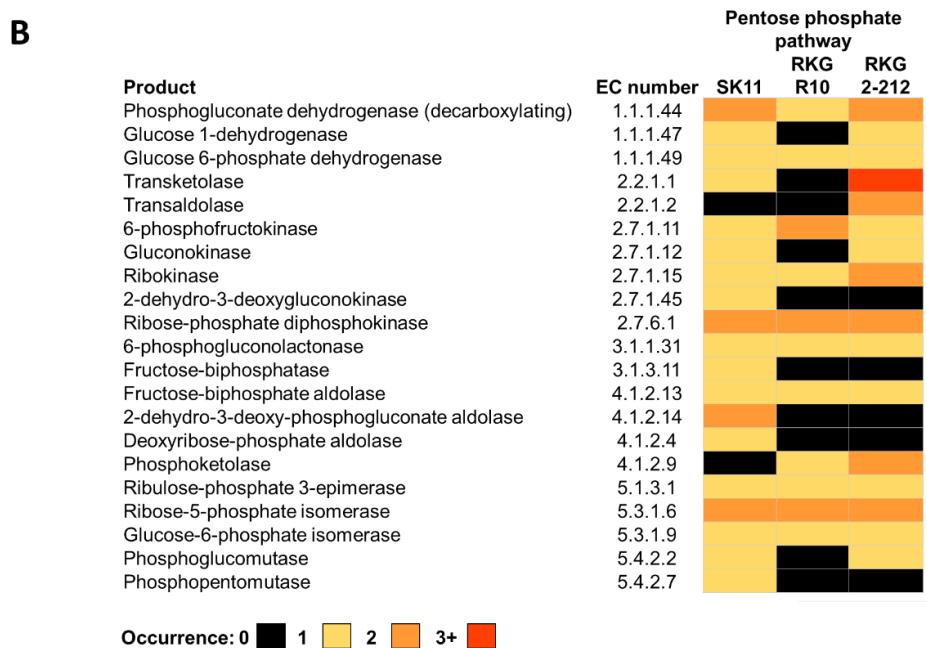
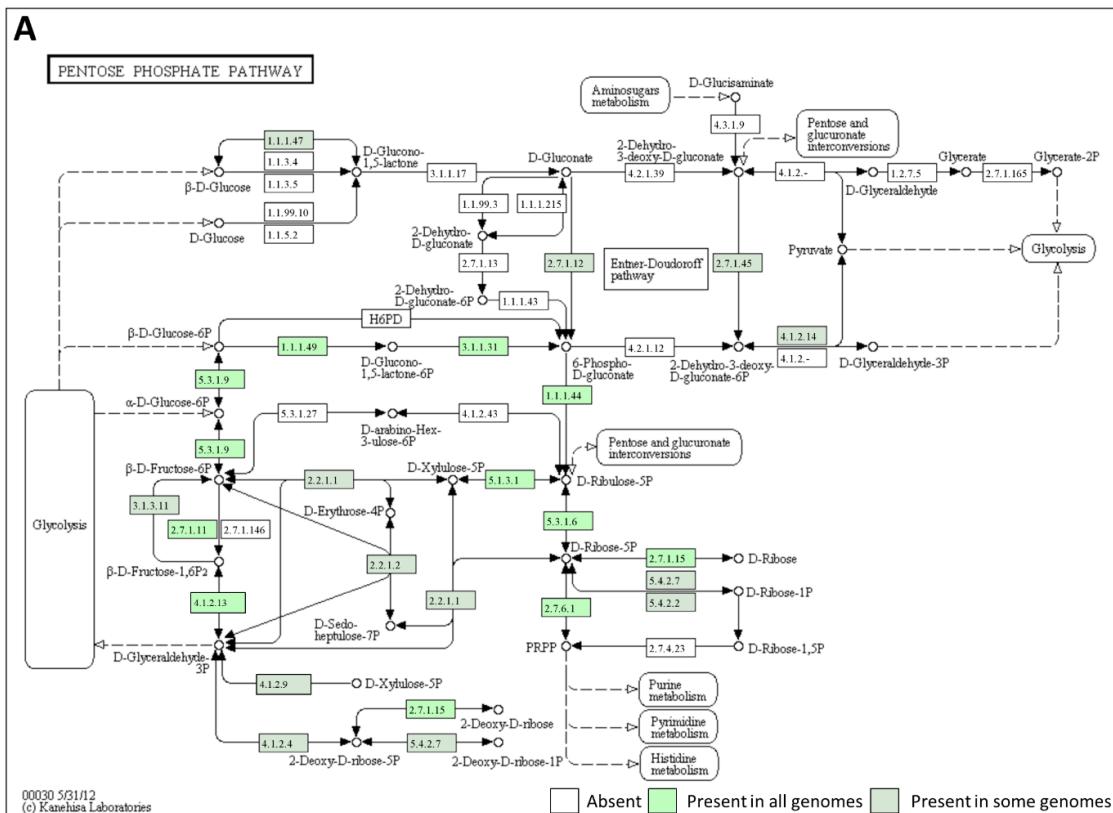
**Figure B1.** A circular graphical display of the distribution of the genome annotations of *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10. From outer to inner rings, there are the contigs, coding sequences on the forward strand, coding sequences on the reverse strand, RNA genes, coding sequences with homology to known antimicrobial resistance genes, coding sequences with homology to known virulence factors, GC content and GC skew. The colors of the coding sequences indicate the subsystem that these genes belong to.



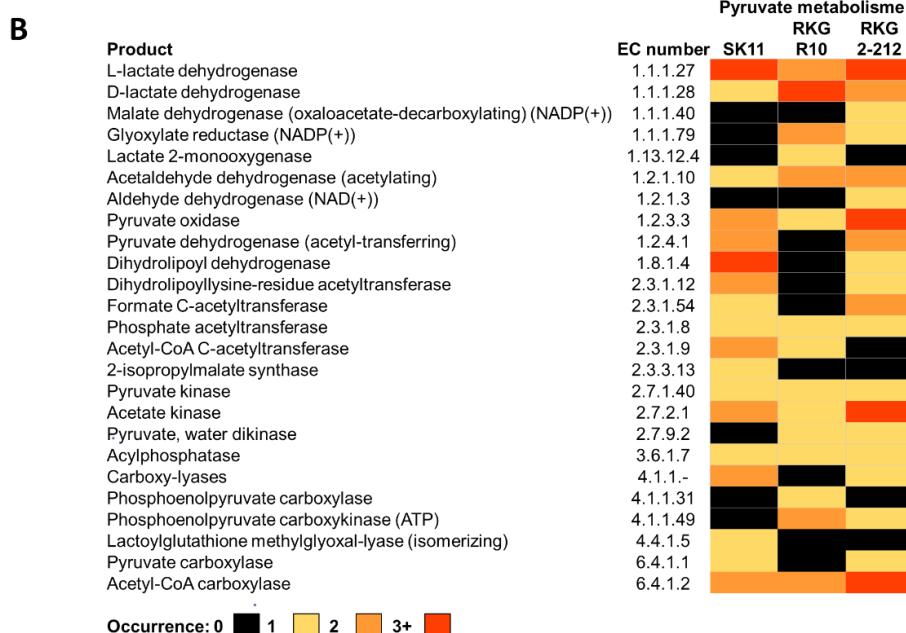
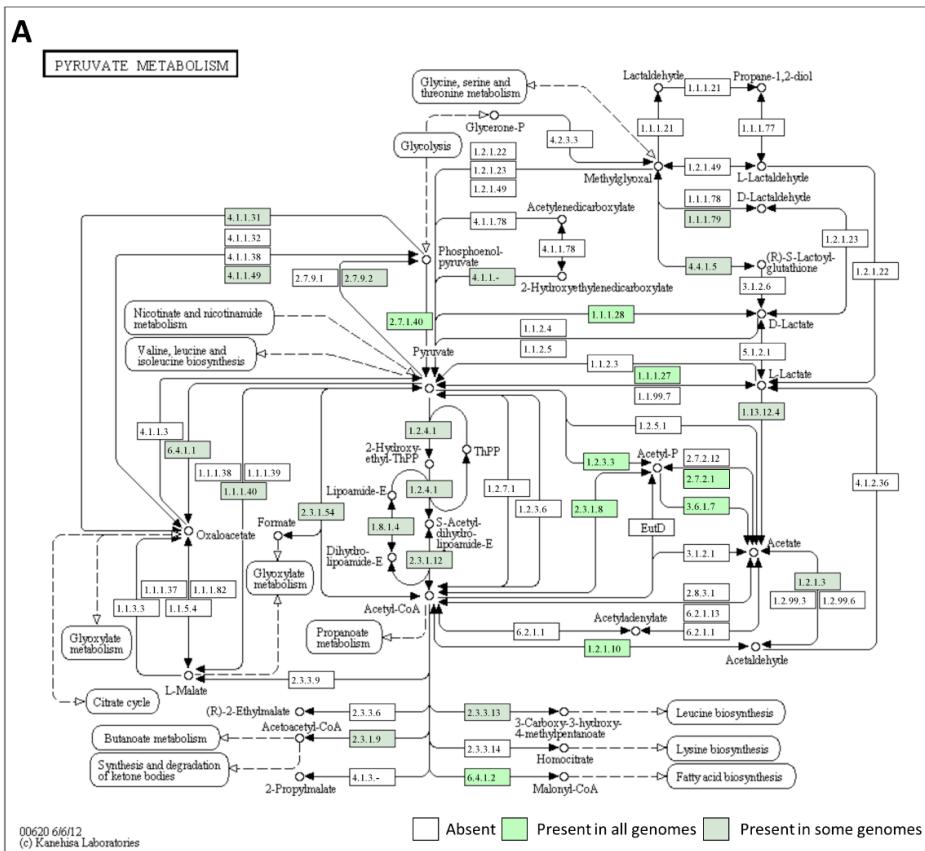
**Figure B2.** A circular graphical display of the distribution of the genome annotations of *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212. From outer to inner rings, there are the contigs, coding sequences on the forward strand, coding sequences on the reverse strand, RNA genes, coding sequences with homology to known antimicrobial resistance genes, coding sequences with homology to known virulence factors, GC content and GC skew. The colors of the coding sequences indicate the subsystem that these genes belong to.



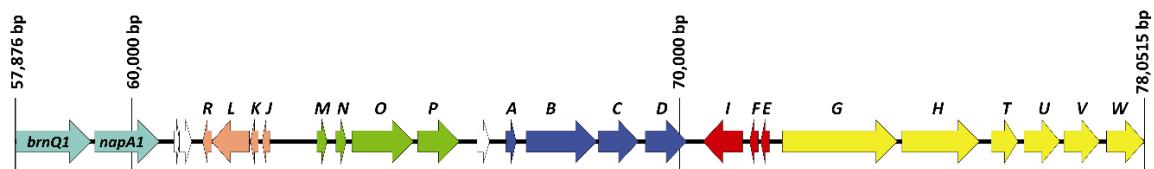
**Figure B3.** Genes related to glycolysis and gluconeogenesis in the genomes of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 and *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212. A) Kegg diagram with differently colored boxes that show the genes present, absent, or incompletely shared. B) Heat map of genes occurrence.



**Figure B4.** Genes related to pentose phosphate pathway in the genomes of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 and *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212. A) Kegg diagram with differently colored boxes that show the genes present, absent, or incompletely shared. B) Heat map of genes occurrence.



**Figure B5.** Genes related to pyruvate metabolism in the genomes of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 and *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212. A) Kegg diagram with differently colored boxes that show the genes present, absent, or incompletely shared. B) Heat map of genes occurrence.



**Figure B6.** The organization of *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 *pln* locus. The genes *brnQ1* and *napA1* are not part of the *pln* locus but they are signified the upper boundary of the locus. Each color represented an operon. Genes colored in white are hypothetical proteins.

**Table B1.** Area under curve (mean  $\pm$  standard error) of volatile organic compounds extracted from cheddar slurry samples not inoculated and inoculated with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 alone and in coculture with *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 or *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 at 0, 6 and 12 days of ripening at 30 °C.

Category	Compounds	RT <sup>1</sup>	Not inoculated		
			0	6	12
Ester	Ethyl acetate	4.470	1.051 $\pm$ 0.021	1.011 $\pm$ 0.059	0.942 $\pm$ 0.103
Unknown	Unknown 1	4.627	6.906 $\pm$ 2.883	10.532 $\pm$ 1.301	145.769 $\pm$ 37.546
Aldehyde	2-Butenal	4.875	ND <sup>2</sup>	ND	ND
Aldehyde	3-Methylbutyraldehyde	4.955	1.063 $\pm$ 0.540	1.418 $\pm$ 0.721	1.699 $\pm$ 0.060
Unknown	1-Butanol\propyl acetate	5.045	50.205 $\pm$ 20.129	42.316 $\pm$ 20.227	43.979 $\pm$ 12.979
Aldehyde	2-Methylbutyraldehyde	5.085	7.780 $\pm$ 2.692	6.910 $\pm$ 3.277	13.084 $\pm$ 2.919
Alkane	Cyclohexane	5.120	3.573 $\pm$ 1.318	2.809 $\pm$ 0.702	3.933 $\pm$ 1.129
Alcohol	1-Penten-3-ol	5.325	15.112 $\pm$ 0.736	20.724 $\pm$ 1.729	12.6904 $\pm$ 1.805
Ketone	2-Pentanone	5.402	6.049 $\pm$ 1.845	6.409 $\pm$ 0.526	4.271 $\pm$ 0.389
Unknown	Unknown 2	5.470	5.116 $\pm$ 1.433	8.095 $\pm$ 0.539	6.444 $\pm$ 0.804
Aldehyde	Heptane	5.555	13.115 $\pm$ 3.993	6.426 $\pm$ 6.426	5.833 $\pm$ 5.83
Alkane	Pentanal	5.566	238.293 $\pm$ 76.302	220.570 $\pm$ 87.824	257.108 $\pm$ 65.685
Unknown	Unknown 3	5.617	1.876 $\pm$ 0.155	9.663 $\pm$ 4.878	11.846 $\pm$ 6.113
Unknown	Unknown 4	5.651	0.191 $\pm$ 0.191	6.104 $\pm$ 0.580	5.954 $\pm$ 2.937
Ketone	2-Hydroxy-2-Butanone (acetoin)	5.720	0.646 $\pm$ 0.154	0.875 $\pm$ 0.149	0.828 $\pm$ 0.509
Nitrile	3-Methylbutanenitrile	6.140	0.871 $\pm$ 0.178	0.668 $\pm$ 0.125	0.519 $\pm$ 0.045
Alcohol	3-Methyl-1-butanol	6.240	0.365 $\pm$ 0.041	0.430 $\pm$ 0.165	0.145 $\pm$ 0.145
Unknown	Unknown 5	6.305	2.898 $\pm$ 0.180	0.862 $\pm$ 0.267	0.426 $\pm$ 0.061
Ketone	(E)-3-penten-2-one	6.413	17.962 $\pm$ 8.037	14.595 $\pm$ 6.897	14.091 $\pm$ 3.413
Aldehyde	2-Methyl-2-butenal	6.505	0.399 $\pm$ 0.133	1.837 $\pm$ 0.448	1.506 $\pm$ 0.208
Aldehyde	(E)-2-pentenal	6.635	3.365 $\pm$ 0.464	2.112 $\pm$ 0.219	1.414 $\pm$ 0.066
Unknown	Unknown 6	6.658	1.795 $\pm$ 0.282	3.483 $\pm$ 0.845	3.359 $\pm$ 0.623
Alcohol	1-Pentanol	6.905	278.545 $\pm$ 109.066260.997 $\pm$ 126.219267.079 $\pm$ 78.490		
Aldehyde	3-Methyl-2-butenal	6.987	0.515 $\pm$ 0.515	ND	ND
Ketone	2-Hexanone	7.407	1.616 $\pm$ 0.410	4.208 $\pm$ 2.787	0.446 $\pm$ 0.428

Alkene	1-Octene	7.453	6.026±0.418	10.660±1.782	17.238±4.791
Alkane	Octane	7.673	656.643±142.004	731.260±161.937	458.017±78.693
Aldehyde	Hexanal	7.702	282.549±67.240	281.601±48.103	685.242±236.641
Ester	Amyl formate	8.107	3.083±0.931	5.172±0.210	3.8560±0.549
Aldehyde	2-Ethylcrotonaldehyde	8.271	3.924±1.519	2.446±1.255	3.049±1.050
Ketone	3-Hexen-2-one	8.421	14.457±5.908	15.381±3.821	14.578±1.712
Aldehyde	(E)-2-hexenal	8.905	3.773±0.724	4.236±0.612	3.588±0.287
Alkane	1-Chlorohexane	9.054	0.602±0.211	1.478±0.220	1.727±0.381
Alcohol	(E)-2-hexen-1-ol	9.200	0.435±0.126	0.834±0.242	0.997±0.274
Alcohol	1-Hexanol	9.330	29.095±13.521	43.166±17.168	56.278±18.282
Ketone	2-Heptanone	9.866	10.194±3.539	11.395±4.253	13.508±3.496
Alkene	1-Nonene	9.927	5.0654±1.790	5.110±1.958	4.763±1.054
Alkene	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	9.981	1.827±1.827	5.205±1.889	3.689±1.375
Aldehyde	(Z)-4-heptenal	10.003	ND	ND	ND
Aldehyde	Heptanal	10.105	94.338±6.579	113.051±7.426	125.449±12.024
Oxide	Pentyloxirane	10.295	2.894±0.904	3.501±0.771	3.703±0.651
Unknown	Unknown 7	10.375	2.608±0.628	1.716±0.640	2.575±0.767
Ester	N-amyl acetate	10.452	1.600±0.697	1.586±0.600	2.634±0.801
Phenol	4-Ethylphenol	10.681	0.271±0.184	2.505±0.175	2.344±0.255
Ester	Hexyl formate	10.835	1.318±0.462	1.536±0.424	1.546±0.290
Aldehyde	2-Ethyl-2-pentenal	10.951	0.853±0.440	1.429±0.232	1.599±0.166
Unknown	Unknown 8	11.240	0.107±0.107	0.962±0.284	0.619±0.350
Unknown	Unknown 9	11.318	0.441±0.233	0.990±0.052	0.731±0.141
Ketone	6-Methyl-2-heptanone	11.444	0.531±0.249	0.676±0.221	0.818±0.208
Unknown	Unknown 10	11.563	1.729±0.572	2.160±0.585	2.552±0.598
Aldehyde	(Z)-2-heptenal	11.600	9.486±1.775	8.780±1.178	8.914±1.077
Alkane	1-Chlorooctane	11.732	ND	1.611±0.895	3.158±1.670
Aldehyde	Benzaldehyde	11.793	23.652±2.468	22.325±3.092	21.376±1.925
Alcohol	1-Heptanol	11.905	1.217±0.125	2.581±0.178	7.845±5.438
Unknown	Unknown 11	12.517	2.524±0.852	2.820±1.084	8.980±5.914
Alkane	Decane	12.589	8.628±1.534	14.781±1.872	23.515±6.993
Aldehyde	Octanal	12.835	17.839±4.398	21.658±6.079	29.531±7.643
Unknown	Unknown 12	12.997	0.591±0.197	1.296±0.162	3.383±0.443
Ester	Hexyl acetate	13.050	1.817±0.429	0.703±0.362	ND
Unknown	Unknown 13	13.663	2.316±0.655	2.922±0.709	4.845±1.573
Ketone	3-Octen-2-one	13.764	10.750±2.979	7.516±2.814	7.397±1.818
Unknown	Unknown 14	14.142	2.799±1.126	2.328±1.360	3.411±1.246
Unknown	Unknown 15	14.275	16.913±4.200	13.623±2.474	13.559±1.638
Unknown	Unknown 16	14.330	6.496±1.819	8.571±1.665	11.293±1.876
Unknown	Unknown 17	14.415	0.528±0.264	1.878±0.339	2.400±0.509
Unknown	Unknown 18	14.585	6.199±2.523	6.763±1.781	6.801±1.487
Unknown	Unknown 19	14.902	0.472±0.108	0.322±0.186	0.461±0.413
Ketone	2-Nonanone	15.144	ND	ND	1.123±0.631
Ketone	3,5-Octadien-2-one	15.176	7.468±0.479	8.413±0.258	6.777±0.866
Alkane	Undecane	15.380	1.359±0.050	1.539±0.050	1.237±0.274

Aldehyde	Nonanal	15.445	10.425±2.293	11.342±2.418	14.870±3.184
Aldehyde	(E)-2-nonenal	16.530	0.292±0.044	0.353±0.0492	0.339±0.141
Alcohol	1-Nonanol	16.841	10.150±0.825	9.406±0.938	8.439±0.779
Alkene	1-Dodecene	17.650	1.010±0.128	1.272±0.159	1.261±0.122
Alkane	Dodecane	17.854	0.415±0.012	0.471±0.029	0.510±0.055
Aldehyde	Decanal	17.977	0.419±0.089	0.447±0.104	0.692±0.175
Aldehyde	(E,E)-2,4-nonadienal	18.203	0.480±0.017	0.628±0.048	0.692±0.069
Lactone	5-Butyldihydro-2(3H)-furanone (Gamma-octalactone)	19.257	1.350±0.477	1.022±0.502	1.643±0.583
Aldehyde	(E)-2-decenal	19.323	2.001±0.520	2.303±0.479	3.353±0.657
Aldehyde	(E,E) 2-4-decadenal	20.085	0.173±0.049	0.187±0.014	0.220±0.032
Ketone	3-Nonen-2-one	20.607	0.191±0.039	0.4801±0.116	0.516±0.086
Unknown	Unknown 20	21.202	0.891±0.338	0.718±0.304	1.083±0.331
Lactone	Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone (Gamma-nonalactone)	21.477	0.268±0.014	0.291±0.020	0.277±0.052
Aldehyde	2-Undecenal	21.645	1.485±0.274	1.587±0.250	2.155±0.374
Alkene	1-Tetradecene	22.238	0.3897±0.024	0.432±0.025	0.411±0.040
Diol	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyn-4,7-diol	22.445	0.141±0.048	0.181±0.046	0.121±0.050
Unknown	Unknown 21	24.931	1.614±0.489	1.971±0.165	2.066±0.321

SK11					
Category	Compounds	RT	0	6	12
Ester	Ethyl acetate	4.470	1.004±0.066	1.005±0.059	0.756±0.107
Unknown	Unknown 1	4.627	74.624±41.471	18.904±8.029	115.331±20.708
Aldehyde	2-Butenal	4.875	ND	ND	0.096±0.096
Aldehyde	3-Methylbutyraldehyde	4.955	0.927±0.464	2.302±0.501	4.344±0.530
Unknown	1-Butanol\propyl acetate	5.045	23.469±8.617	23.724±9.806	43.843±13.187
Aldehyde	2-Methylbutyraldehyde	5.085	7.540±2.904	5.131±1.983	11.886±2.467
Alkane	Cyclohexane	5.120	1.774±0.524	1.850±0.335	3.468±1.110
Alcohol	1-Penten-3-ol	5.325	19.728±3.042	16.746±3.226	14.639±1.026
Ketone	2-Pentanone	5.402	8.291±1.164	4.548±1.771	10.490±5.769
Unknown	Unknown 2	5.470	3.787±1.266	2.630±1.984	6.562±2.522
Aldehyde	Heptane	5.555	7.585±0.993	45.443±26.283	188.414±69.897
Alkane	Pentanal	5.566	141.388±39.207	113.794±76.377	2.105±1.162
Unknown	Unknown 3	5.617	1.116±1.116	12.0062±9.203	34.368±6.458
Unknown	Unknown 4	5.651	1.916±1.063	5.400±3.199	10.888±1.365
Ketone	2-Hydroxy-2-Butanone (acetoin)	5.720	29.773±8.559	28.720±8.360	25.199±8.0329
Nitrile	3-Methylbutanenitrile	6.140	1.357±0.744	1.242±0.740	0.510±0.071
Alcohol	3-Methyl-1-butanol	6.240	0.586±0.073	0.582±0.252	2.455±2.443
Unknown	Unknown 5	6.305	4.076±0.208	0.740±0.200	1.756±1.241
Ketone	(E)-3-penten-2-one	6.413	5.995±3.059	8.218±3.095	14.881±4.435
Aldehyde	2-Methyl-2-butenal	6.505	0.550±0.069	0.808±0.240	1.483±0.391
Aldehyde	(E)-2-pentenal	6.635	3.227±0.229	1.772±0.009	0.734±0.367
Unknown	Unknown 6	6.658	1.337±0.087	2.871±0.572	4.474±0.897
Alcohol	1-Pentanol	6.905	124.963±47.811	153.184±68.120	241.820±110.220
Aldehyde	3-Methyl-2-butenal	6.987	0.578±0.578	ND	2.117±2.117

Ketone	2-Hexanone	7.407	1.063±0.151	1.263±0.510	6.916±4.447
Alkene	1-Octene	7.453	8.8999±0.701	8.853±1.199	16.688±3.162
Alkane	Octane	7.673	454.042±42.371	125.073±125.073306.845±176.873	
Aldehyde	Hexanal	7.702	236.926±41.700	396.841±101.944411.964±129.469	
Ester	Amyl formate	8.107	1.583±0.210	3.597±0.522	3.375±0.272
Aldehyde	2-Ethylcrotonaldehyde	8.271	1.513±0.454	1.403±0.572	2.780±0.818
Ketone	3-Hexen-2-one	8.421	5.636±2.447	10.215±2.292	13.820±2.646
Aldehyde	(E)-2-hexenal	8.905	3.121±0.161	3.368±0.451	2.552±0.482
Alkane	1-Chlorohexane	9.054	0.530±0.059	1.260±0.183	1.988±0.181
Alcohol	(E)-2-hexen-1-ol	9.200	0.372±0.064	0.592±0.193	0.747±0.202
Alcohol	1-Hexanol	9.330	13.255±5.550	49.430±11.984	103.553±27.905
Ketone	2-Heptanone	9.866	5.815±1.604	8.067±2.318	13.790±4.929
Alkene	1-Nonene	9.927	3.585±0.145	3.481±0.411	3.079±3.079
Alkene	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	9.981	7.250±1.546	4.428±2.276	5.652±2.161
Aldehyde	(Z)-4-heptenal	10.003	ND	ND	ND
Aldehyde	Heptanal	10.105	89.504±4.627	105.792±12.324	109.900±16.548
Oxide	Pentyloxirane	10.295	2.094±0.343	2.694±0.520	3.621±0.746
Unknown	Unknown 7	10.375	2.297±0.200	1.350±0.337	1.842±0.603
Ester	N-amyl acetate	10.452	1.081±0.340	1.068±0.261	2.139±0.690
Phenol	4-Ethylphenol	10.681	0.179±0.103	2.133±0.213	2.016±0.337
Ester	Hexyl formate	10.835	1.121±0.223	1.242±0.120	1.486±0.348
Aldehyde	2-Ethyl-2-pentenal	10.951	0.634±0.171	1.143±0.142	1.504±0.380
Unknown	Unknown 8	11.240	0.373±0.191	1.139±0.255	1.004±0.537
Unknown	Unknown 9	11.318	0.477±0.098	0.923±0.067	1.072±0.267
Ketone	6-Methyl-2-heptanone	11.444	0.413±0.128	0.514±0.097	0.769±0.190
Unknown	Unknown 10	11.563	0.989±0.497	1.960±0.545	1.593±0.972
Aldehyde	(Z)-2-heptenal	11.600	8.056±0.875	7.195±1.044	6.708±1.988
Alkane	1-Chlorooctane	11.732	ND	2.253±0.660	4.068±0.695
Aldehyde	Benzaldehyde	11.793	21.678±1.145	16.512±2.392	15.832±3.861
Alcohol	1-Heptanol	11.905	1.453±0.114	2.400±0.145	2.298±0.739
Unknown	Unknown 11	12.517	1.386±0.404	2.191±0.701	7.182±2.591
Alkane	Decane	12.589	7.3456±0.245	12.948±1.967	18.839±2.873
Aldehyde	Octanal	12.835	11.984±1.938	19.503±6.052	26.528±7.356
Unknown	Unknown 12	12.997	0.416±0.054	2.899±0.179	3.247±0.400
Ester	Hexyl acetate	13.050	2.634±0.390	0.425±0.425	ND
Unknown	Unknown 13	13.663	1.413±0.373	3.314±1.478	5.489±1.111
Ketone	3-Octen-2-one	13.764	6.780±1.087	5.556±1.654	6.421±2.042
Unknown	Unknown 14	14.142	1.100±0.619	1.713±0.947	2.960±1.201
Unknown	Unknown 15	14.275	11.479±1.342	11.584±2.107	9.267±2.071
Unknown	Unknown 16	14.330	3.809±0.930	6.049±1.744	8.128±2.612
Unknown	Unknown 17	14.415	0.506±0.077	1.863±0.413	2.473±0.446
Unknown	Unknown 18	14.585	6.438±1.640	6.302±1.438	7.295±2.205
Unknown	Unknown 19	14.902	0.144±0.076	0.021±0.021	0.043±0.043
Ketone	2-Nonanone	15.144	0.331±0.331	ND	0.668±0.668
Ketone	3,5-Octadien-2-one	15.176	6.799±0.760	7.4146±0.439	6.753±0.189

Alkane	Undecane	15.380	1.422±0.123	1.466±0.024	1.501±0.100
Aldehyde	Nonanal	15.445	6.914±1.157	10.410±2.659	14.020±3.458
Aldehyde	(E)-2-nonenal	16.530	0.233±0.018	0.283±0.016	0.387±0.120
Alcohol	1-Nonanol	16.841	11.321±1.587	9.510±0.150	6.535±0.698
Alkene	1-Dodecene	17.650	1.400±0.203	1.310±0.026	1.1670±0.067
Alkane	Dodecane	17.854	0.449±0.029	0.477±0.015	0.473±0.023
Aldehyde	Decanal	17.977	0.279±0.046	0.426±0.117	0.613±0.174
Aldehyde	(E,E)-2,4-nonadienal	18.203	0.441±0.026	0.727±0.038	0.627±0.045
Lactone	5-Butyldihydro-2(3H)-furanone (Gamma-octalactone)	19.257	0.674±0.237	0.774±0.410	1.338±0.525
Aldehyde	(E)-2-decenal	19.323	1.216±0.229	2.522±0.620	3.016±0.664
Aldehyde	(E,E) 2-4-decadenal	20.085	0.228±0.048	0.253±0.004	0.262±0.012
Ketone	3-Nonen-2-one	20.607	0.209±0.036	0.871±0.072	0.863±0.157
Unknown	Unknown 20	21.202	0.394±0.174	0.532±0.254	0.903±0.350
Lactone	Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone (Gama-nonalactone)	21.477	0.250±0.039	0.246±0.050	0.305±0.026
Aldehyde	2-Undecenal	21.645	1.032±0.114	1.621±0.339	1.982±0.407
Alkene	1-Tetradecene	22.238	0.445±0.054	0.442±0.033	0.387±0.029
Diol	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyn-4,7-diol	22.445	0.196±0.051	0.142±0.013	0.147±0.027
Unknown	Unknown 21	24.931	2.809±0.294	2.636±0.200	1.657±0.194

#### SK11 + RKG R10

Category	Compounds	RT	0	6	12
Ester	Ethyl acetate	4.470	0.982±0.056	0.954±0.027	0.597±0.112
Unknown	Unknown 1	4.627	11.652±5.311	106.279±60.280	159.700±47.067
Aldehyde	2-Butenal	4.875	ND	ND	0.083±0.048
Aldehyde	3-Methylbutyraldehyde	4.955	0.445±0.445	2.111±0.331	5.080±1.381
Unknown	1-Butanol\propyl acetate	5.045	12.786±0.491	12.853±2.815	20.040±12.666
Aldehyde	2-Methylbutyraldehyde	5.085	2.924±0.332	8.712±3.812	12.755±2.430
Alkane	Cyclohexane	5.120	1.125±0.120	1.78±0.212	2.827±0.067
Alcohol	1-Penten-3-ol	5.325	18.602±0.729	17.789±3.366	15.710±3.940
Ketone	2-Pentanone	5.402	7.807±0.358	4.868±1.053	162.306±116.898
Unknown	Unknown 2	5.470	2.589±0.685	4.697±0.716	3.5703±0.3034
Aldehyde	Heptane	5.555	4.940±1.040	44.663±39.681	82.990±23.141
Alkane	Pentanal	5.566	86.975±6.682	64.274±31.536	2.312±0.340
Unknown	Unknown 3	5.617	1.521±0.769	16.178±8.096	27.710±3.021
Unknown	Unknown 4	5.651	1.068±0.948	7.233±1.936	13.041±0.594
Ketone	2-Hydroxy-2-Butanone (acetoin)	5.720	32.660±9.673	33.870±10.888	30.7948±10.4608
Nitrile	3-Methylbutanenitrile	6.140	1.403±0.565	0.771±0.228	0.408±0.016
Alcohol	3-Methyl-1-butanol	6.240	0.372±0.042	1.058±0.542	3.908±2.102
Unknown	Unknown 5	6.305	3.496±0.073	0.735±0.294	1.721±0.950
Ketone	(E)-3-penten-2-one	6.413	2.436±0.108	5.226±1.263	8.187±1.776
Aldehyde	2-Methyl-2-butenal	6.505	0.448±0.029	0.821±0.163	1.243±0.312
Aldehyde	(E)-2-pentenal	6.635	2.953±0.270	1.960±0.061	0.773±0.388
Unknown	Unknown 6	6.658	1.180±0.026	2.642±0.820	4.077±0.445
Alcohol	1-Pentanol	6.905	65.350±4.558	78.070±11.612	90.381±25.484

Aldehyde	3-Methyl-2-butenal	6.987	1.302±0.127	1.060±1.060	ND
Ketone	2-Hexanone	7.407	0.771±0.039	0.820±0.171	23.386±23.386
Alkene	1-Octene	7.453	7.855±0.178	8.946±1.914	29.360±11.811
Alkane	Octane	7.673	352.649±41.914	394.8584±20.895281.017±39.440	
Aldehyde	Hexanal	7.702	173.758±21.669	345.857±62.388	369.531±82.792
Ester	Amyl formate	8.107	1.185±0.080	4.265±0.738	3.196±0.595
Aldehyde	2-Ethylcrotonaldehyde	8.271	0.921±0.056	0.933±0.151	0.922±0.112
Ketone	3-Hexen-2-one	8.421	2.764±0.121	8.121±1.269	10.632±1.748
Aldehyde	(E)-2-hexenal	8.905	2.642±0.214	3.372±0.286	1.890±0.407
Alkane	1-Chlorohexane	9.054	0.417±0.040	1.184±0.212	1.836±0.091
Alcohol	(E)-2-hexen-1-ol	9.200	0.244±0.021	0.566±0.142	0.569±0.106
Alcohol	1-Hexanol	9.330	5.555±1.090	22.914±3.135	110.064±42.362
Ketone	2-Heptanone	9.866	3.763±0.224	5.585±0.677	2.295±2.295
Alkene	1-Nonene	9.927	2.931±0.165	2.942±0.323	105.842±82.974
Alkene	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	9.981	7.879±0.256	6.946±0.818	8.329±0.564
Aldehyde	(Z)-4-heptenal	10.003	ND	ND	0.260±0.260
Aldehyde	Heptanal	10.105	77.039±6.182	102.793±4.111	87.283±12.271
Oxide	Pentyloxirane	10.295	1.568±0.115	2.080±0.256	2.396±0.205
Unknown	Unknown 7	10.375	1.927±0.123	0.950±0.031	0.872±0.091
Ester	N-amyl acetate	10.452	0.674±0.106	0.694±0.076	1.078±0.109
Phenol	4-Ethylphenol	10.681	0.044±0.044	2.055±0.230	2.352±0.214
Ester	Hexyl formate	10.835	0.827±0.065	1.032±0.096	1.179±0.164
Aldehyde	2-Ethyl-2-pentenal	10.951	0.446±0.061	0.853±0.079	0.963±0.177
Unknown	Unknown 8	11.240	0.498±0.057	1.337±0.059	1.676±0.100
Unknown	Unknown 9	11.318	0.342±0.051	0.991±0.034	1.376±0.076
Ketone	6-Methyl-2-heptanone	11.444	0.256±0.029	0.4201±0.011	0.595±0.081
Unknown	Unknown 10	11.563	0.194±0.194	0.399±0.399	0.531±0.531
Aldehyde	(Z)-2-heptenal	11.600	7.341±0.837	8.229±0.992	5.463±1.176
Alkane	1-Chlorooctane	11.732	ND	1.292±0.649	2.756±0.154
Aldehyde	Benzaldehyde	11.793	19.817±1.405	17.082±0.532	11.060±1.858
Alcohol	1-Heptanol	11.905	1.341±0.116	1.909±0.328	2.877±1.476
Unknown	Unknown 11	12.517	0.901±0.068	1.460±0.076	13.938±6.818
Alkane	Decane	12.589	6.540±0.474	11.987±0.974	15.780±1.338
Aldehyde	Octanal	12.835	8.698±0.818	14.580±0.491	13.920±1.343
Unknown	Unknown 12	12.997	2.229±0.928	1.753±0.645	2.503±0.196
Ester	Hexyl acetate	13.050	0.839±0.839	0.934±0.471	ND
Unknown	Unknown 13	13.663	1.060±0.103	2.969±0.686	3.224±0.399
Ketone	3-Octen-2-one	13.764	5.024±0.519	4.593±0.213	3.345±0.358
Unknown	Unknown 14	14.142	0.501±0.095	0.910±0.038	1.322±0.076
Unknown	Unknown 15	14.275	9.077±0.794	10.852±0.475	7.125±0.739
Unknown	Unknown 16	14.330	2.614±0.294	5.037±0.081	4.289±0.934
Unknown	Unknown 17	14.415	0.154±0.154	1.562±0.085	1.781±0.129
Unknown	Unknown 18	14.585	6.930±0.609	5.262±0.160	5.110±0.776
Unknown	Unknown 19	14.902	0.138±0.100	ND	3.494±2.802
Ketone	2-Nonanone	15.144	ND	ND	2.366±2.366

Ketone	3,5-Octadien-2-one	15.176	6.417±0.530	7.603±0.077	29.876±23.880
Alkane	Undecane	15.380	1.386±0.149	1.6934±0.047	1.632±0.111
Aldehyde	Nonanal	15.445	5.018±0.489	8.206±0.137	8.175±0.598
Aldehyde	(E)-2-nonenal	16.530	0.194±0.011	0.292±0.016	0.2527±0.030
Alcohol	1-Nonanol	16.841	11.209±0.623	10.278±0.217	7.004±0.457
Alkene	1-Dodecene	17.650	1.422±0.128	1.466±0.009	1.494±0.254
Alkane	Dodecane	17.854	0.388±0.047	0.499±0.009	0.458±0.046
Aldehyde	Decanal	17.977	0.207±0.018	0.321±0.005	0.329±0.033
Aldehyde	(E,E)-2,4-nonadienal	18.203	0.386±0.030	0.743±0.021	0.594±0.050
Lactone	5-Butyldihydro-2(3H)-furanone (Gamma-octalactone)	19.257	0.351±0.010	0.447±0.031	0.454±0.0230
Aldehyde	(E)-2-decenal	19.323	0.878±0.067	2.001±0.082	2.024±0.113
Aldehyde	(E,E) 2-4-decadienal	20.085	0.230±0.020	0.266±0.007	0.245±0.028
Ketone	3-Nonen-2-one	20.607	0.206±0.017	0.990±0.052	1.134±0.066
Unknown	Unknown 20	21.202	0.194±0.017	0.328±0.012	0.332±0.037
Lactone	Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone (Gamma-nonalactone)	21.477	0.208±0.027	0.251±0.020	0.309±0.020
Aldehyde	2-Undecenal	21.645	0.812±0.066	1.355±0.054	1.409±0.097
Alkene	1-Tetradecene	22.238	0.441±0.040	0.476±0.018	0.432±0.035
Diol	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyn-4,7-diol	22.445	0.210±0.018	0.223±0.010	0.209±0.013
Unknown	Unknown 21	24.931	2.378±0.368	2.008±0.271	1.578±0.397

#### SK11 + RKG 2-212

Category	Compounds	RT	0	6	12
Ester	Ethyl acetate	4.470	0.933±0.059	13.491±12.658	13.113±6.192
Unknown	Unknown 1	4.627	69.602±42.633	42.857±26.851	176.544±28.417
Aldehyde	2-Butenal	4.875	ND	ND	0.555±0.555
Aldehyde	3-Methylbutyraldehyde	4.955	0.865±0.469	0.465±0.181	1.159±0.859
Unknown	1-Butanol\propyl acetate	5.045	29.609±18.613	41.467±9.629	5.536±0.476
Aldehyde	2-Methylbutyraldehyde	5.085	8.032±1.388	7.914±1.793	66.770±24.660
Alkane	Cyclohexane	5.120	2.369±0.775	3.708±1.216	6.501±1.601
Alcohol	1-Penten-3-ol	5.325	15.384±0.601	14.496±2.932	20.177±1.400
Ketone	2-Pentanone	5.402	6.005±0.463	5.073±0.597	9.478±1.207
Unknown	Unknown 2	5.470	2.563±0.960	6.404±1.518	7.289±2.345
Aldehyde	Heptane	5.555	1.845±1.845	27.887±15.173	96.257±25.930
Alkane	Pentanal	5.566	164.95±83.246	36.085±26.656	5.334±1.576
Unknown	Unknown 3	5.617	1.490±1.490	10.076±7.084	17.577±0.411
Unknown	Unknown 4	5.651	2.014±0.232	7.727±3.265	6.574±1.198
Ketone	2-Hydroxy-2-Butanone (acetoin)	5.720	32.296±10.4078	45.730±11.627	241.259±85.482
Nitrile	3-Methylbutanenitrile	6.140	0.734±0.088	0.2950±0.052	0.424±0.104
Alcohol	3-Methyl-1-butanol	6.240	0.724±0.524	1.997±1.006	0.067±0.032
Unknown	Unknown 5	6.305	3.105±0.029	3.577±0.418	6.088±2.732
Ketone	(E)-3-penten-2-one	6.413	8.795±6.876	7.358±2.286	11.640±6.656
Aldehyde	2-Methyl-2-butenal	6.505	0.522±0.146	0.816±0.187	2.751±0.732
Aldehyde	(E)-2-pentenal	6.635	3.383±0.737	1.806±0.332	0.581±0.368
Unknown	Unknown 6	6.658	1.128±0.076	2.283±0.844	6.258±0.618

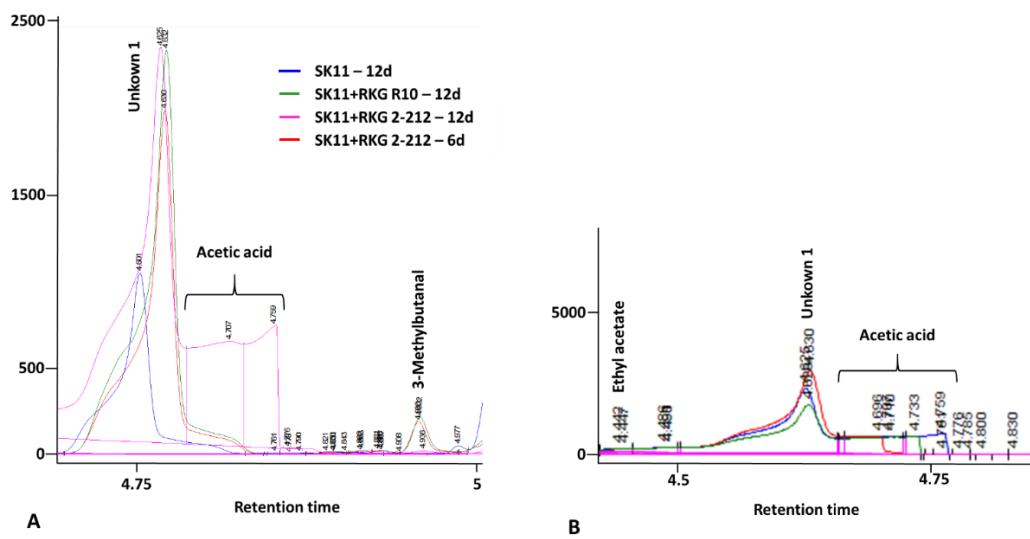
Alcohol	1-Pentanol	6.905	179.496±121.153375.253±157.274496.093±243.107	
Aldehyde	3-Methyl-2-butenal	6.987	0.495±0.495	1.894±1.894 0.945±0.473
Ketone	2-Hexanone	7.407	2.641±1.994	6.451±3.183 3.309±1.073
Alkene	1-Octene	7.453	8.071±1.468	14.683±4.474 18.961±4.380
Alkane	Octane	7.673	487.408±157.785172.160±108.864141.086±29.390	
Aldehyde	Hexanal	7.702	266.307±98.548	144.181±90.662 85.376±39.835
Ester	Amyl formate	8.107	1.937±0.843	3.021±0.247 3.213±0.035
Aldehyde	2-Ethylcrotonaldehyde	8.271	2.545±1.728	1.994±0.718 2.06217±1.154
Ketone	3-Hexen-2-one	8.421	8.059±5.711	7.903±2.430 8.123±3.198
Aldehyde	(E)-2-hexenal	8.905	3.258±0.842	3.592±1.208 2.719±1.526
Alkane	1-Chlorohexane	9.054	0.531±0.158	1.637±0.253 3.075±1.232
Alcohol	(E)-2-hexen-1-ol	9.200	0.371±0.142	0.517±0.358 ND
Alcohol	1-Hexanol	9.330	23.558±16.945	546.327±281.4831186.273±283.467
Ketone	2-Heptanone	9.866	7.695±4.343	10.293±3.255 5.497±4.052
Alkene	1-Nonene	9.927	4.043±1.501	3.530±0.146 18.498±9.447
Alkene	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	9.981	4.735±1.544	6.776±0.971 8.174±0.742
Aldehyde	(Z)-4-heptenal	10.003	ND	ND 1.547±0.105
Aldehyde	Heptanal	10.105	89.789±13.771	52.690±31.087 18.521±6.194
Oxide	Pentyloxirane	10.295	2.824±1.435	4.004±0.900 3.532±0.661
Unknown	Unknown 7	10.375	2.641±0.925	2.734±1.046 1.772±0.599
Ester	N-amyl acetate	10.452	1.493±0.897	2.130±0.859 2.803±0.919
Phenol	4-Ethylphenol	10.681	0.197±0.150	2.202±0.390 1.490±0.273
Ester	Hexyl formate	10.835	1.142±0.444	1.969±0.192 2.260±0.699
Aldehyde	2-Ethyl-2-pentenal	10.951	0.722±0.344	1.025±0.254 0.413±0.191
Unknown	Unknown 8	11.240	0.313±0.163	1.270±0.687 1.288±0.403
Unknown	Unknown 9	11.318	0.492±0.167	1.365±0.240 0.924±0.292
Ketone	6-Methyl-2-heptanone	11.444	0.461±0.227	1.104±0.299 0.783±0.395
Unknown	Unknown 10	11.563	1.303±0.902	1.352±1.352 2.631±1.056
Aldehyde	(Z)-2-heptenal	11.600	8.693±2.036	9.574±2.155 5.643±2.799
Alkane	1-Chlorooctane	11.732	ND	3.211±1.058 6.058±2.971
Aldehyde	Benzaldehyde	11.793	21.309±3.654	10.460±3.937 4.470±1.581
Alcohol	1-Heptanol	11.905	1.277±0.064	38.301±6.836 100.024±20.084
Unknown	Unknown 11	12.517	1.896±1.043	2.950±0.916 9.576±7.514
Alkane	Decane	12.589	7.581±2.120	15.051±2.252 32.827±15.182
Aldehyde	Octanal	12.835	14.125±5.881	19.424±9.283 8.360±5.696
Unknown	Unknown 12	12.997	1.1642±0.611	2.204±1.009 1.066±0.468
Ester	Hexyl acetate	13.050	1.482±0.797	0.943±0.480 2.299±0.305
Unknown	Unknown 13	13.663	1.785±0.672	3.775±0.847 3.357±1.366
Ketone	3-Octen-2-one	13.764	8.295±3.480	6.875±2.501 5.592±2.453
Unknown	Unknown 14	14.142	1.871±1.315	2.753±1.424 3.358±1.543
Unknown	Unknown 15	14.275	13.875±5.234	11.992±3.948 6.728±3.154
Unknown	Unknown 16	14.330	5.084±2.326	7.893±3.059 8.967±3.527
Unknown	Unknown 17	14.415	0.396±0.211	2.315±0.573 3.498±1.284
Unknown	Unknown 18	14.585	8.046±1.457	7.325±2.524 7.729±0.791
Unknown	Unknown 19	14.902	0.379±0.299	ND 0.754±0.754

Ketone	2-Nonanone	15.144	ND	0.629±0.629	ND
Ketone	3,5-Octadien-2-one	15.176	7.090±0.959	5.868±0.662	6.479±0.899
Alkane	Undecane	15.380	1.381±0.143	1.842±0.137	2.683±0.913
Aldehyde	Nonanal	15.445	8.117±3.115	11.289±4.767	8.925±4.859
Aldehyde	(E)-2-nonenal	16.530	0.277±0.088	0.243±0.072	0.448±0.267
Alcohol	1-Nonanol	16.841	10.573±0.171	9.5689±1.332	6.278±1.744
Alkene	1-Dodecene	17.650	1.184±0.113	1.493±0.050	1.729±0.280
Alkane	Dodecane	17.854	0.412±0.036	0.754±0.065	1.079±0.364
Aldehyde	Decanal	17.977	0.318±0.118	0.665±0.241	0.871±0.446
Aldehyde	(E,E)-2,4-nonadienal	18.203	0.449±0.080	1.165±0.194	1.049±0.306
Lactone	5-Butyldihydro-2(3H)-furanone (Gamma-octalactone)	19.257	0.987±0.610	1.284±0.797	1.499±0.875
Aldehyde	(E)-2-decenal	19.323	1.481±0.611	4.035±1.844	5.234±2.613
Aldehyde	(E,E) 2-4-decanediol	20.085	0.216±0.021	0.307±0.023	0.414±0.049
Ketone	3-Nonen-2-one	20.607	0.201±0.011	1.135±0.026	1.763±0.210
Unknown	Unknown 20	21.202	0.566±0.363	0.749±0.440	0.863±0.461
Lactone	Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone (Gamma-nonolactone)	21.477	0.279±0.026	0.333±0.066	0.426±0.033
Aldehyde	2-Undecenal	21.645	1.146±0.335	2.469±1.038	3.827±1.757
Alkene	1-Tetradecene	22.238	0.409±0.020	0.424±0.019	0.443±0.030
Diol	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyn-4,7-diol	22.445	0.172±0.034	0.140±0.038	0.174±0.053
Unknown	Unknown 21	24.931	2.0677±0.321	1.655±0.405	1.550±0.378

<sup>1</sup>RT: Retention time <sup>2</sup>Not detected

**Table B2.** P-values of linear model regression of Time \* Treatment of the volatile organic compounds extracted from cheddar slurry samples not inoculated and inoculated with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 alone and in coculture with *Lactobacillus delbrueckii* RKG R10 or *Lactiplantibacillus plantarum* RKG 2-212 at 0, 6 and 12 days of ripening at 30 °C.

	Treatment				Time				Treatment*Time					
	SK11 +SK11 +				SK11 +SK11 +				SK11 +SK11 +		SK11 +SK11 +			
	RKG		RKG		RKG		RKG		SK11:	R10:	2-212:	SK11:	R10:	2-212:
	NI	SK11	R10	2-212	12 d	6 d	6 d	6 d	6 d	6 d	6 d	12 d	12 d	12 d
1-Heptanol	0.543	0.670	0.814	0.894	<b>0.003</b>	<u>0.086</u>	0.675	0.479	< <b>0.001</b>	0.135	0.155	<b>&lt;0.001</b>		
4-Ethylphenol	<b>0.047</b>	0.965	0.199	0.949	0.109	0.106	0.995	0.375	0.983	0.987	0.359	0.978		
3-Methyl-1-butanol	0.704	0.901	0.996	0.986	<b>0.005</b>	0.981	0.981	0.868	0.432	<u>0.064</u>	<b>0.023</b>	0.079		
Pentanal	<b>0.012</b>	0.875	0.759	0.872	0.959	0.981	0.751	0.805	0.643	< <b>0.001</b>	0.343	0.391		
Heptanal	<b>0.419</b>	0.987	0.948	0.983	0.929	0.954	0.995	0.980	<u>0.083</u>	0.971	0.970	0.662		
2-Methylbutyraldehyde	< <b>0.001</b>	0.996	<u>0.090</u>	0.682	0.157	0.770	0.719	0.110	0.891	0.636	0.237	<b>0.045</b>		
Benzaldehyde	< <b>0.001</b>	0.773	0.531	0.657	0.719	0.805	0.561	0.839	<u>0.054</u>	0.325	0.192	< <b>0.001</b>		
(E,E)-2,4-decadienal	< <b>0.001</b>	0.106	<u>0.064</u>	0.125	0.116	0.428	0.990	0.979	0.423	0.805	0.367	0.186		
(Z)-4-heptenal	< <b>0.001</b>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.096	< <b>0.001</b>		
(E)-2-pentenal	0.701	0.995	0.978	0.997	0.847	0.917	0.982	0.993	0.979	<u>0.052</u>	0.318	0.291		
3-Methylbutyraldehyde	0.164	0.988	0.280	0.979	0.279	0.974	0.431	0.131	0.553	0.897	0.373	0.920		
2-Ethyl-2-pentenal	<u>0.076</u>	0.839	0.679	0.856	<b>0.032</b>	<u>0.057</u>	0.650	0.663	0.496	0.575	0.630	<b>0.021</b>		
Octane	<u>0.064</u>	0.946	0.903	0.094	0.943	0.980	<b>0.020</b>	0.999	0.826	<b>0.023</b>	0.988	0.899		
1,3,5,7-Cyclooctatetraene	< <b>0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>	<b>0.024</b>	<b>0.031</b>	<b>0.031</b>	<b>0.030</b>	<b>0.039</b>		
1-Dodecene	0.966	<b>0.047</b>	<b>0.031</b>	0.289	0.148	0.144	0.217	0.384	0.961	<b>0.046</b>	0.371	0.537		
Hexyl acetate	0.904	0.950	<u>0.058</u>	0.337	<b>0.006</b>	0.301	0.473	0.166	0.481	0.964	0.172	<b>0.009</b>		
3-Nonen-2-one	< <b>0.001</b>	0.614	0.579	0.658	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	<b>0.047</b>	<b>0.017</b>	<b>0.004</b>	<u>0.054</u>	< <b>0.001</b>	< <b>0.001</b>		
2-Hydroxy-2-butanone	0.781	0.151	0.145	0.149	<b>0.041</b>	0.893	0.913	0.926	0.982	0.126	0.146	<b>0.047</b>		
2-Pentanone	<b>0.001</b>	0.498	0.540	0.862	0.694	0.779	0.278	0.419	0.686	0.736	<b>0.015</b>	0.426		



## Annexe C – Matériel supplémentaire du chapitre 4

**Table C1.** PCR steps for identification of enterococci by multiplex PCR

Step	Temperature	Time
Initial Denaturation	94 °C	4 min
Denaturation	94 °C	30 s
Primer Annealing	55 °C	60 s
Extension	72 °C	60 s
Final Extension	72 °C	7 min

**Table C2.** Multiplex PCR primers for identification of enterococci

Multiplex group	Specie	Primers	Sequence 5'→3'	Amplicon size (bp)
1	<i>E. faecalis</i>	FL1	ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC	360
		FL2	TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG	
4	<i>E. faecium</i>	FM1B	TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG	214
		FM2B	CGG CTG CTT TTT TGA ATT CTT CT	
4	<i>E. durans</i>	DU1B	ACT GAT ATT AAG ACA GCG GTA CAA	256
		DU2B	AGA TAG GTG TTT GGC CTG TCA T	
5	<i>E. avium</i>	AV1	GCT GCG ATT GAA AAA TAT CCG	361
		AV2B	TGA TCG GTG TTT TTC CAT CAG TT	
5	<i>E. hirae</i>	HI1	CTT TCT GAT ATG GAT GCT GTC	186
		HI2	AAA TTC TTC CTT AAA TGT TGC	

**Table C3.** Multiplex PCR conditions for identification of enterococci

Multiplex group	Product	Volume ( $\mu$ L)	Final concentration
1	Nuclease-free water	34.75	
	10 x PCR Buffer	5	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	dNTPs mix	1	200 $\mu$ M
	Group 1 primers	2 of each	0,2 $\mu$ M
	DNA polymerase	0.25	1,25 U
4	DNA	1	0.5 ng/ $\mu$ L
	Nuclease-free water	38.75 $\mu$ L	
	10 x PCR Buffer	5	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	dNTPs mix	1	200 $\mu$ M
	Group 4 primers	2 of each	0,2 $\mu$ M
5	DNA polymerase	0.25	1,25 U
	DNA	1	0.5 ng/ $\mu$ L
	Nuclease-free water	5	
	10 x PCR Buffer	1	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	dNTPs mix	2 of each	200 $\mu$ M
5	Group 5 primers	0.25	0,2 $\mu$ M
	DNA polymerase	1	1,25 U
	DNA	5	0.5 ng/ $\mu$ L

**Table C4.** PCR steps for identification of *Streptococcus thermophilus* by PCR

Step	Temperature	Time
Initial Denaturation	94 °C	4 min
Denaturation	94 °C	30 s
Primer Annealing	55 °C	60 s
Extension	72 °C	60 s
Final Extension	72 °C	7 min

**Table C5.** PCR conditions for identification of *Streptococcus thermophilus*

Product	Volume (µL)	Final concentration
Nuclease-free water	35.75	
10 x PCR Buffer	5	2 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs mix	1	200 µM
lacZ-F (5'-CAC TAT GCT CAG AAT ACA-3')	2,5	0,25 µM
lacZ-R (5'-CGA ACA GCA TTG ATG TTA-3')	2,5	0,25 µM
DNA polymerase	0.25	1,25 U
DNA	1	0.5 ng/µL

**Table C6.** PCR steps for detection of seven types of vancomycin-resistant enterococci by multiplex PCR

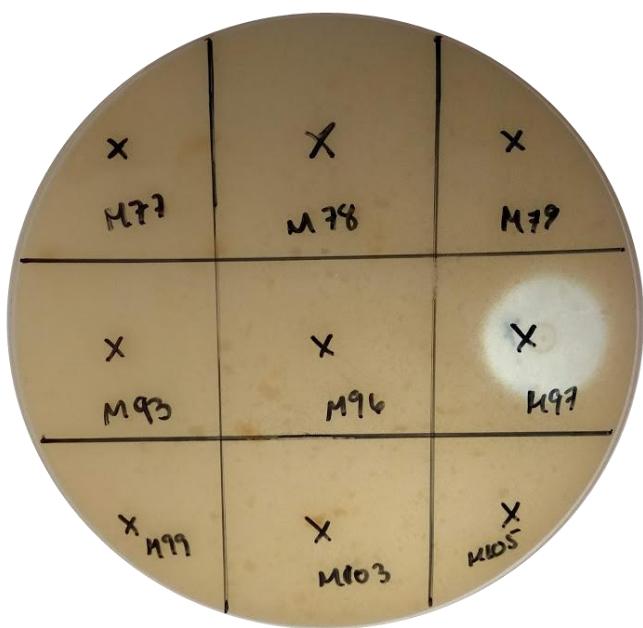
Step	Temperature	Time
Initial Denaturation	94 °C	2 min
Denaturation	94 °C	60 s
Primer Annealing	64 °C	60 s
Extension	68 °C	60 s
Final Extension	68 °C	7 min

**Table C7.** Multiplex PCR primers for detection of seven types of vancomycin-resistant enterococci (VRE)

VRE determinant	Primer (Sequence 5'→3')	Amplicon size (bp)
<i>vanA</i>	F: GCA AGT CAG GTG AAG ATG GA R: GCT AAT ACG ATC AAG CGG TC	721
<i>vanB</i>	F: GAT GTG TCG GTA AAA TCC GC R: CCA CTT CGC CGA CAA TCA AA	640
<i>vanC1</i>	F: GTA TCA AGG AAA CCT CGC GA R: CGT AGG ATA ACC CGA CTT CC	836
<i>vanC2/3</i>	F: GCA AAC GTT GGT ACC TGA TG R: GCA AAC GTT GGT ACC TGA TG	523
<i>vanD/D4</i>	F: TGG AAT CAC AAA ATC CGG CG R: TWC CCG CAT TTT TCA CAA CS	311
<i>vanM</i>	F: GGC AGA GAT TGC CAA CAA CA R: AGG TAA ACG AAT CTG CCG CT	425
<i>vanN</i>	F: CCT CAA ATC AGC AGC TAG TG R: GCT CCT GAT AAG TGA TAC CC	941

**Table C8.** PCR conditions for identification of detection of seven types of vancomycin-resistant enterococci by multiplex PCR

Product	Volume (µL)	Final concentration
Nuclease-free water	14.75	
10 x PCR Buffer	5	2 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs mix	1	200 µM
Primers	2 of each	0,2 µM
DNA polymerase	0.25	1,25 U
DNA	1	0.5 ng/µL



**Figure C1.** Proteolytic activity test on Milk Agar. Proteolytic strains as *Enterococcus faecalis* M97 are producing a clear halo.