



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Master BioMANE 2^{ème} année

Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement

Spécialité Microbiologie Environnementale et Sanitaire (MES)

Année Universitaire 2014-2015

Etude de la dynamique de bactéries pathogènes lors du stockage de produits résiduels organiques issus de la méthanisation : influence de déterminants biotiques (activité microbienne) et de la biodisponibilité de la matière organique

Mémoire présenté par Anaïs CUNY

Stage effectué du 2 février au 31 juillet 2015

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE), INRA, Narbonne

Encadré par Dr Géraldine MAYNAUD (post doctorante) et Dr Nathalie WERY (Chargé de Recherche)

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Philippe Steyer, le directeur du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de Narbonne, de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de son laboratoire. Je tiens tout particulièrement à remercier mes encadrants, Nathalie Wéry, pour son aide et son soutien tout au long de mon stage. Ainsi que Géraldine Maynaud, pour son sa patience, ainsi que son aide et son soutien, non seulement pour ce stage mais aussi dans ma recherche de thèse et pour avoir partagé avec moi ses connaissances et expériences dans le domaine scientifique. Je voudrais aussi remercier Anaïs Bonnafous, pour m'avoir formé en biologie moléculaire mais aussi m'avoir soutenu dans mes différentes démarches et Jérôme Hamelin, de m'avoir apporté son aide dans ma recherche de thèse. Enfin je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire, pour leur accessibilité, leur aide, leur soutien et leur bonne humeur.

Sommaire

| | | |
|------|---|----|
| I. | Introduction | 6 |
| A. | La méthanisation | 6 |
| 1. | Le procédé de méthanisation | 6 |
| 2. | Les produits obtenus et leurs devenir..... | 9 |
| B. | Les caractéristiques microbiologiques des Produits Résiduaire Organiques (PRO)..... | 10 |
| 1. | Contaminants microbiologiques présents dans les PROs après traitement anaérobie | 10 |
| 2. | Paramètres impliqués dans la survie des bactéries pathogènes | 12 |
| 3. | Les espèces bactériennes concernées par l'étude | 13 |
| 4. | La réglementation et les normes pour l'épandage des PROs..... | 14 |
| C. | Le déroulement du stage..... | 14 |
| 1. | Présentation du laboratoire | 14 |
| 2. | Présentation et objectifs du stage..... | 15 |
| II. | Matériels et méthodes..... | 16 |
| A. | Caractérisations physiques, microbiologiques et biochimiques des PROs..... | 16 |
| 1. | Les PROs de l'étude | 16 |
| 2. | Les analyses physiques | 16 |
| 3. | Mesure de la biodégradabilité anaérobie : tests de potentiel méthanogène(BMP)..... | 16 |
| 4. | Caractérisation de la matière organique par fractionnement chimique séquentiel | 17 |
| 5. | Les analyses microbiologiques | 18 |
| B. | Suivi de la persistance de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Salmonella</i> Derby dans les PROs en microcosmes par des analyses moléculaires..... | 20 |
| 1. | Les PROs sélectionnés et la mise en place des microcosmes..... | 20 |
| 2. | Quantification des bactéries pathogènes dans les microcosmes au cours du temps par analyses moléculaires..... | 20 |
| C. | Analyses statistiques..... | 22 |
| III. | Résultats | 22 |
| A. | Caractérisation des PROs du stage | 22 |
| 1. | Caractéristiques physico-chimiques | 22 |
| 2. | Caractérisation de la matière organique par fractionnement chimique séquentiel | 23 |
| 3. | Caractérisation microbiologique..... | 25 |
| B. | Suivi de la persistance de <i>Listeria</i> sp. et <i>Salmonella</i> sp. dans les PROs en microcosmes par des analyses moléculaires | 29 |
| C. | Analyses statistiques..... | 32 |
| IV. | Discussion..... | 35 |
| V. | Bibliographie..... | 41 |
| VII. | Annexes | 46 |
| | Résumé : | 52 |

Liste des Abréviations

ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BMP : Biochemical Methane Potential

CFU : Colony Forming Unit

CT : Threshold Cycle

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DO : Densité Optique

DOM : matière organique dissoute

FDA : Fluorescéine Di-Acétate

Ferm : PRO issu de sites agricoles

GC-MS : Gas Chromatography – Mass Spectrometry

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IRSTEA : Institut National de Recherche en Sciences et Technologie pour l'Environnement et l'Agriculture.

LBE : Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

MB : Matière Brute

MS : Matière Sèche

MV : Matière Volatile

NEOM : non extractable organic matter

OMR : Ordures Ménagères Résiduelles

PEOM : poorly extractable organic matter

PRO : Produit Résiduaire Organique

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

REOM : readily extractable organic matter

RLU : Relative Light Unit

SEOM : slowly extractable organic matter

SPOM : soluble fraction from particular organic matter

STEP : STation d'EPuration

Terri : PRO issu de sites territoriaux

VBNC : Viable But Non Cultivable

I. Introduction

Chaque année, 355 millions de tonnes de déchets sont produits par an en France (de toute origine dont les déchets industriels et de construction, les ordures ménagères, les déchets de traitement des eaux urbaines...) et environ 374 millions de tonnes de déchets d'origine agricole. Ces derniers correspondent en grande partie à des déchets d'animaux de type fumier, des effluents d'élevage de type lisier ou à des résidus de culture. Ces déchets peuvent être valorisés par méthanisation (ou digestion anaérobie) afin de produire du biogaz, utilisable à des fins énergétiques, et un résidu organique le digestat. Ce dernier, riche en éléments fertilisants peut être épandu en tant qu'amendement organique. Bien que la filière de méthanisation représente un atout environnemental majeur, nous avons peu d'informations sur l'innocuité du digestat. En effet celui-ci provenant du traitement de matières fécales animales ou humaines, peut être contaminé par des microorganismes pathogènes à cause d'une élimination insuffisante des pathogènes après digestion anaérobie ou à cause d'une recroissance microbienne lors du stockage du digestat. Par conséquent, la valorisation du digestat en tant que matière fertilisante peut être remise en cause lors d'un retour au sol. La plupart des études sur le devenir des microorganismes pathogènes lors du stockage et de l'épandage des digestats sont focalisées sur l'influence des facteurs abiotiques (pH, température, humidité...) mais peu décrivent l'impact des facteurs biotiques tels que la diversité et l'activité microbienne ainsi que du devenir de la matière organique. Dans un contexte de développement de la filière de méthanisation et de la valorisation du digestat en agronomie, l'objectif de ce stage est donc d'étudier la persistance de microorganismes pathogènes lors du stockage de digestats ou de sous-produits animaux et de rechercher les paramètres biotiques et abiotiques qui permettent leur survie afin de mieux les contrôler.

A. La méthanisation

1. Le procédé de méthanisation

Parmi les différents types de déchets pouvant être valorisés par méthanisation, on retrouve les déchets d'origine agricole (déjections animales, résidus végétaux...), les déchets issus de l'industrie agro-alimentaire, les ordures ménagères ainsi que les boues de stations d'épuration (Bastide, 2014). Le procédé de méthanisation est réalisé par des bactéries méthanogènes, capables de dégrader la matière organique riche en carbone et de le recycler en méthane (CH₄) et en dioxyde de carbone (CO₂). Ce procédé se décompose en 4 étapes de réduction de la matière organique et fait intervenir différentes microflore de bactéries et archées spécifiques (Figure 1) (Moletta, 2008).

a) Les différentes étapes de la méthanisation

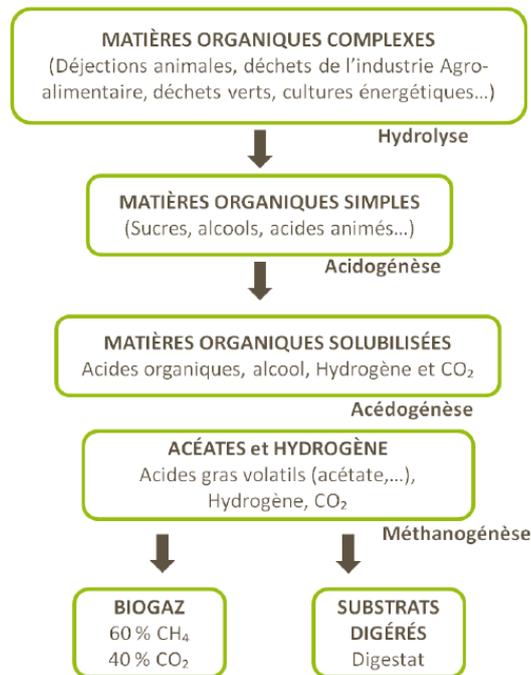


Figure 1 : Schéma détaillé du procédé de méthanisation issu de www.biogaz-energie-renouvelable.info/methanisation_schema.html

La première étape de la digestion anaérobie est une étape d'hydrolyse qui peut être réalisée par un grand nombre de bactéries anaérobies strictes ou anaérobies facultatives. On peut par exemple retrouver dans cette première étape des bactéries appartenant au genre (i) *Clostridium* sp. capables de dégrader des substrats tels que la cellulose ou encore les protéines, (ii) d'autres du genre *Bacillus* sp. dégradant essentiellement les protéines ou (iii) des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sp. qui elles dégradent l'amidon. Lors de cette étape, la matière organique complexe (composée de polysaccharides, lipides et autres molécules complexes) est réduite en monomères plus simples (sucres, acides gras ou acides aminés). Ces monomères seront directement utilisés dans la seconde étape qui est l'acidogénèse. Cette étape fait intervenir une flore bactérienne fermentaire où les monomères sont transformés en acides gras, alcool ainsi qu'en dihydrogène (H₂) et CO₂. Ces intermédiaires seront ensuite utilisés lors de l'étape d'acédogénèse, qui permet la production (i) d'acétate à partir des acides gras par les bactéries homoacéto-gènes (genre *Butyribacterium* sp., *Acetobacterium* sp.) (ii) de H₂ par la microflore acéto-gène (*Syntrophomonas wolfei*) et (iii) de CO₂ par les bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio* sp., *Desulfobacter* sp.). Certains composés produits précédemment, et notamment l'acétate, le formate, le CO₂ et le H₂, sont des précurseurs directs du CH₄. Les organismes méthanogènes appartenant au règne *Archaea* peuvent donc entrer en jeu dans la voie de production du méthane à partir : (i) de H₂ et CO₂ par les *Archaea* hydrogénéophiles

(*Methanobacterium* sp., *Methanogenum* sp.) ou (ii) à partir de l'acétate par les *Archaea* acétotrophes (*Methanosarcina* sp. essentiellement) (Moletta, 2008).

b) Les paramètres de la méthanisation

Différents paramètres physico-chimiques sont importants afin d'assurer une activité optimale de la méthanisation :

- La température : elle influence la vitesse de dégradation de la matière organique et donc la quantité de biogaz produite. La méthanisation peut être réalisée dans 3 gammes de température différentes : (i) la voie psychrophile (entre 15 et 25°C) qui permet une dégradation stable mais assez lente de la matière organique (dégradation en 50 jours environ). Ce régime de fonctionnement est le moins utilisé sur les installations agro-industrielles. (ii) La voie mésophile (entre 30 et 40°C) permet une dégradation plus rapide de la matière organique (dégradation en environ 30 jours) tout en étant relativement stable. La grande majorité des systèmes industriels travaillent en régime mésophile. (iii) Enfin la voie thermophile (entre 50 et 60°C) induit une dégradation très rapide de la matière organique (dégradation en 15 jours environ) et peut traiter des charges organiques plus importantes (grâce à une croissance rapide des microorganismes). Ce dernier système est plus sensible aux modifications extérieures et doit donc être contrôlé beaucoup plus régulièrement (énergies renouvelables, 2009).
- Le pH : ce paramètre est l'un des plus importants dans le fonctionnement d'une unité de méthanisation et sa stabilité est signe du bon fonctionnement de l'unité. Les bactéries anaérobies et notamment les archées méthanogènes sont sensibles aux variations de pH. Le pH optimal du processus de méthanisation se situe entre 6,5 et 7,5. L'accumulation d'acides gras volatils lors d'une surcharge du méthaniseur entraîne une chute rapide du pH à des valeurs inférieures à 5,0 ce qui entraîne une inhibition du processus de méthanisation. Ce phénomène d'acidose peut survenir lors de l'incorporation en trop grande quantité de substrats très méthanogènes tels que les graisses des industries agro-alimentaires. Des valeurs de pH supérieures à 7,5 induites notamment par l'accumulation d'ammoniac entraînent une inhibition microbienne et des risques de précipitation des minéraux et donc de prise en masse de l'intérieur du réacteur biologique. Sur certaines unités de méthanisation, une régulation du pH à base de soude peut-être mise en place (Frederic).
- Le taux de charge organique : il correspond à la quantité quotidienne de matière organique introduite dans le réacteur par unité de volume du réacteur biologique. Un taux de charge organique trop élevé peut entraîner une inhibition de la méthanisation due à une production trop importante d'acides gras volatils (Frederic).
- La composition en nutriments : pour croître dans des conditions optimales, les bactéries anaérobies ont besoin de macronutriments tels que le carbone (C), l'azote (N) (notamment sous

forme d'ammonium) et le phosphore (P). Le ratio optimal C/N/P est estimé à 100/5/1. Des éléments minéraux sont aussi nécessaires, tels que le magnésium entrant en jeu dans la synthèse finale de méthane, le potassium, le calcium, le fer, le cuivre, le nickel, le cobalt (Frederic)

- Les inhibiteurs de la méthanisation : certains composés toxiques ou présents en trop fortes quantités peuvent limiter, voir arrêter le développement des microorganismes méthanogènes et donc réduire la production de biogaz comme l'oxygène, l'ammoniac, le chlorure de sodium, des métaux lourds (cuivre, chrome, nickel ...), ainsi que les substances antibiotiques et antiseptiques (énergies renouvelables, 2009).

2. Les produits obtenus et leurs devenir

a) Biogaz

Le biogaz produit lors de la dégradation de la matière organique au cours de la digestion anaérobie est composé principalement de CH₄, à hauteur de 50 à 75%, et de CO₂, variant de 25 à 50%, en fonction de la composition de la matière organique en entrée (Apeisa, 2007). Le biogaz produit peut être utilisé pour fournir différentes sources d'énergies telles que la production de chaleur, d'électricité, l'injection du biométhane dans le réseau du gaz naturel, ou encore pour produire du carburant (ADEME).

b) Digestat

Le digestat est le produit organique résiduel issu du processus de méthanisation. Il est composé de la matière organique non dégradée lors de la digestion ainsi que de la matière minérale composée d'azote (sous forme ammoniac), de phosphore ou encore de potassium, ainsi que d'oligoéléments. Cette composition apporte au digestat une forte valeur fertilisante. Son utilisation permettrait l'obtention de meilleurs rendements agricoles, notamment grâce à la teneur importante en azote ammoniacal directement assimilé par les végétaux. Selon un essai au champ, l'apport de digestat permettrait de palier à l'utilisation d'engrais azoté ; l'efficacité étant similaire (Muller, 2011). Selon ce rapport, l'apport de digestat issus de ferme augmenterait de 6 à 20% les rendements de production végétale. Plus particulièrement un digestat issu de lisier aurait permis d'augmenter le rendement de cultures de graminées et de légumineuses de 45% (par rapport à des cultures n'ayant pas été traitées). Le digestat peut être utilisé brut ou après des transformations qui permettront d'en améliorer la qualité. Par exemple, la séparation de phase du digestat brut permet l'obtention d'une fraction solide riche en matière organique stabilisée et en phosphore et d'une fraction liquide riche en azote ammoniacal qui pourra directement être utilisé comme engrais azoté (Orgaterre, 2004). Ce digestat peut aussi subir une étape de compostage. Il s'agit d'une étape de digestion en aérobiose, qui permet une hygiénisation du digestat par la production de chaleur mais aussi par l'ammonification. Le compostage entraîne la diminution d'un grand nombre de microorganismes et permet de stabiliser

le digestat (Besson, 2010). Ces différents produits obtenus (digestat brut, digestat composté ou phase liquide ou solide du digestat après séparation de phase), sont appelés Produits Résiduaux Organiques (PRO).

B. Les caractéristiques microbiologiques des Produits Résiduaux Organiques (PRO)

1. Contaminants microbiologiques présents dans les PROs après traitement anaérobie

Les intrants agricoles utilisés pour la méthanisation contiennent de nombreux agents pathogènes, dont la prévalence et l'abondance dépend de l'origine des déchets. Les principaux pathogènes retrouvés appartiennent à 3 groupes de microorganismes : bactérie, virus et parasite.

Parmi les agents pathogènes les plus présents dans les effluents agricoles et les boues de Stations d'Épuration (STEP), on retrouve des espèces bactériennes telles que *Salmonella* sp, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ainsi que *Campylobacter coli* et *C. jejuni* (Arthurson, 2008), des parasites comme *Giardia*, *Cryptosporidium* et des helminthes ; et enfin des virus entériques tels que les enterovirus, rotavirus, parvovirus (Manyi-Loh *et al.*, 2013). Il n'existe actuellement que peu de données sur les quantités de microorganismes présents dans les effluents d'élevage. Quelques exemples de concentrations en indicateurs de contamination fécale et bactéries pathogènes retrouvés dans des effluents d'élevage sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Exemple de concentration en bactéries pathogènes dans différents déchets en entrée de méthaniseur : (¹Manyi-Loh *et al.*, 2013 ;²Vanotti *et al.*, 2005 ; ND : non déterminé)

| Espèces bactériennes | Lisier bovin (UFC/g) ¹ | lisier porcin (UFC/g) ² |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 10 ⁴ | ND |
| Entérocoques | 10 ⁵ | 10 ^{5.73} |
| Coliformes | ND | 10 ^{6.79} |
| <i>Salmonella</i> sp. | ND | 10 ^{3.39} |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 10 ¹ | ND |

Le traitement de ces déchets par digestion anaérobie en voie mésophile apparaît peu efficace sur la teneur des bactéries pathogènes. Nous n'obtenons un abattement que de l'ordre de 2 log, après environ 20 jours de traitement quelque soit le déchet traité (Tableau 2). Aussi, le traitement mésophile ne se révèle pas efficace pour toutes les espèces bactériennes, comme par exemple pour *Campylobacter jejuni* où le traitement n'a aucun effet sur la réduction du pathogène (Horan *et al.*, 2004). Avery *et al.* (2014) ont mis en évidence le même résultat, lors d'une étude sur 115 échantillons divers ayant subi un traitement de digestion anaérobie mésophile, avec un abattement moyen des bactéries indicatrices de contamination fécale et bactéries pathogènes d'environ 2 log (2 log pour *Listeria* et jusqu'à 3 log pour *Salmonella*).

Selon l'étude de Paavola et Rintala (2008), il a été montré, que lors d'un traitement de digestion anaérobie en voie thermophile, une réduction jusqu'à 5 log était observée pour les entérobactéries, streptocoques et coliformes. De plus, la réduction est beaucoup plus rapide en thermophilie, le temps pour réduire 90% de la population bactérienne n'est que de quelques jours alors qu'il peut aller jusqu'à plusieurs mois en mésophilie (Watcharasukarn *et al.*, 2009). En complément de la digestion anaérobie, le digestat peut subir différents pré-traitements, comme la pasteurisation et/ ou des post-traitements comme le compostage. La pasteurisation consiste en une hygiénisation du digestat grâce à un chauffage à 70°C pendant 1h. Aucun microorganisme pathogène n'est retrouvé après cette étape (Bagge *et al.*, 2005). Le compostage, qui est une étape de digestion aérobie, peut aussi être utilisé en complément de la méthanisation. Ce traitement permet une production de chaleur importante (par respiration aérobie), ainsi qu'une augmentation du pH (par dégradation des protéines), entraînant une diminution importante du taux de microorganismes pathogènes (Heinonen-Tanski *et al.*, 2006).

Ces produits résiduels issus de méthanisation compostés ou non et ayant subi des pré-traitements hygiénisants sont ensuite stockés en attendant d'être épandus. Ces différents traitements n'ayant pas totalement éliminés les pathogènes (surtout lors d'une digestion anaérobie en voie mésophile), il peut être observé une recroissance des différents agents pathogènes. Aussi, malgré l'efficacité du traitement thermophile ou de la pasteurisation, une recontamination des digestats par des bactéries pathogènes ne peut être écartée (Bagge *et al.*, 2005). Le tableau 2 montre des exemples de taux d'abattement suite aux différents traitements ainsi que des exemples de taux de recontamination au cours du stockage. Cependant, la recroissance de pathogènes au cours du stockage pourrait aussi s'expliquer par une contamination extérieure, les PROs étant souvent stockés à l'air libre.

Tableau 2 : abattement de diverses bactéries pathogènes dans des déchets agricoles après i) traitement anaérobie mésophile (Paavola & Rintala, 2008), ii) traitement anaérobie thermophile (Paavola & Rintala, 2008), iii) compostage (Heinonen-Tanski *et al.*, 2006) et la recontamination après 2 mois de stockage, après un pré-traitement de pasteurisation puis une étape de digestion anaérobie (Bagge *et al.*, 2005)

| espèce bactérienne | abattement (log) | | | recontamination (log) |
|--------------------|------------------|--------------|------------|-----------------------|
| | mésophilie | thermophilie | compostage | |
| Coliformes | 1 à 3 | 1 à 4 | 5 | 1 à 2 |
| Entérocoques | 1 | 3 à 4 | ND | 0 à 2 |
| Entérobactéries | 1 | 3 à 4 | ND | ND |

2. Paramètres impliqués dans la survie des bactéries pathogènes

Après traitement par digestion anaérobie suivi ou non d'une étape de compostage, comme nous l'avons vu précédemment la concentration en pathogènes est faiblement réduite, il peut y avoir une recroissance au cours du stockage sous l'influence de différents facteurs. La majorité des facteurs décrits dans la survie de pathogènes sont des facteurs physico-chimiques tels que la température, le pH et l'humidité.

Par exemple pour *Salmonella* sp., il a été observé une recroissance à des températures mésophiles (20 à 40°C) et à des pourcentages d'humidité supérieurs à 20%. Il a été montré qu'à 40% d'humidité, le taux de concentration en salmonelles passait de 10^3 à 10^9 bactéries /g en deux jours dans des boues de STEP compostées. D'autres facteurs comme la teneur en matière volatile ou le ratio carbone/azote ont leur importance dans le contrôle de cette recroissance. La teneur en matière volatile représente la source en nutriments potentiellement accessible par les microorganismes. Il a été démontré que dans des boues compostées, aucune recroissance de *Salmonella* sp. n'était observée à des taux de matière volatiles inférieurs à 18%. Les mêmes observations ont été faites pour un ratio carbone/azote inférieur à 15 :1 ; le carbone étant le facteur limitant (Russ & Yanko, 1981). Enfin, plus le temps de stockage (dans des conditions où le taux d'humidité est inférieur à 20%) du PRO est long, plus la concentration en pathogènes est faible (Sidhu *et al.*, 2001).

Ainsi, de nombreuses informations sont connues concernant l'influence des facteurs abiotiques sur la survie des bactéries pathogènes, et ce depuis de nombreuses années. Cependant, nous n'avons que peu d'informations sur l'influence de facteurs biotiques sur la survie des pathogènes dans les PROs. Quelques études s'y sont néanmoins intéressées, il a été montré, par exemple, qu'un compost non stérilisé contenant une flore microbienne endogène permet de limiter le développement de *Salmonella* sp. par compétition pour la ressource (Sidhu *et al.*, 2001). De plus, un

nombre non négligeable de bactéries entériques pourraient, après avoir subi un stress (comme la dessiccation), entrer dans un état de dormance de type viable mais non cultivable (VBNC), rendant ces bactéries très résistantes (Russ & Yanko, 1981). Elles seraient alors capables dans des conditions plus favorables telles que durant le stockage de se redévelopper et donc recontaminer la matrice environnementale. Plus récemment, en 2009, une étude a démontré qu'au cours du stockage, il y avait une augmentation de la diversité de la microflore intrinsèque, ce qui avait pour impact une diminution du taux de bactéries pathogènes (Paniel *et al.*, 2010). Aussi, des études réalisées sur les composts ont montré que plus le compost est mature plus la survie de pathogènes inoculés est courte (Paniel *et al.*, 2010 ; Lemunier *et al.*, 2005). Cette étude indique donc que la survie des bactéries pathogènes semble dépendante de la disponibilité de la matière organique.

Les paramètres biotiques semblent donc jouer un rôle prépondérant dans l'abattement des pathogènes et semblent liés à la limitation en substrat, la compétition entre bactéries, la prédation par les eucaryotes (Feng *et al.*, 2010) ou encore à la stabilisation de la matière organique.

3. Les espèces bactériennes concernées par l'étude

Dans le cadre du stage, nous nous intéressons à la survie de 2 bactéries pathogènes classiquement retrouvées dans les effluents d'élevage : *Salmonella* Derby et *Listeria monocytogenes*.

a) *Salmonella* Derby

De la famille des *Enterobacteriaceae*, les salmonelles sont des bacilles à Gram négative. Ce sont des bactéries mésophiles aéro- anaérobies qui ont un optimum de croissance entre 35 et 37°C et à des pH de 4,5 à 9 (ANSES, 2011). Le genre *Salmonella* contient 2 espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*, qui sont ensuite divisées en plusieurs sérotype (Brenner *et al.*, 2000). Quatre sérotypes sont responsables d'infections chez l'humain : *S. typhimurium*, *S. enteridis*, *S. newport* et *S. heidelberg*. La plupart de ces espèces ont un réservoir animal, et se retrouve surtout au niveau de l'appareil digestif des animaux de fermes, volailles, bovins et porcins. C'est pourquoi la principale voie de contamination chez l'Homme est la voie alimentaire. Cette bactérie cause principalement des symptômes de gastroentérite (Velge *et al.*, 2004). C'est une bactérie capable de survivre longtemps au cours du stockage (3 mois dans le lisier bovin) et cours de la digestion anaérobie (6 mois pendant le traitement anaérobie des boues de STEP). D'après une étude sur le lisier de porc de 69 élevages, il a été montré que ¼ des lisiers porcins étaient contaminés par *Salmonella* sp. et ce à des concentrations pouvant aller jusqu'à 350 UFC/g (Fablet *et al.*, 2007).

b) *Listeria monocytogenes*

De la famille des *Listeriaceae*, il s'agit d'une bactérie en forme de bacille, Gram positive, ubiquitaire, ayant un optimum de croissance de 30 à 37°C et à un pH de 7 mais pouvant croître dans des gammes beaucoup plus étendues (une température entre 1°C et 45°C et un pH entre 4,5 et 9,2).

Le genre *Listeria* contient 6 espèces (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* et *L. grayi*) (Rocourt & Buchrieser, 2009). *L. monocytogenes* cause la listériose, qui est l'une des infections bactériennes la plus mortelle chez l'humain. Elle colonise le tractus intestinal, d'où le fait que la principale voie de contamination soit la voie alimentaire. Cette bactérie cause des symptômes de gastro-entérites, cependant les symptômes peuvent être plus importants chez les personnes immunodéprimées (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Peu de données sont disponibles quant à la concentration en *Listeria* dans les digestats, cependant c'est une bactérie très résistante, capable de survivre longtemps dans les sols ainsi que dans les matrices agricoles de type lisier (Pourcher *et al.*, 2012).

4. La réglementation et les normes pour l'épandage des PROs

L'épandage des produits résiduels organiques est soumis à des réglementations. Elles sont de 2 types en fonction de l'effectif animal de l'élevage. La réglementation ICPR (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) pour un élevage supérieur à 50 animaux et RSD (Règlement Sanitaire Départemental) si l'élevage est inférieur à 50 animaux, il y a aussi une réglementation spécifique pour les boues de STEP. Ces réglementations déterminent par exemple les distances d'épandage à respecter vis-à-vis des habitations, des cours d'eau, lieux de baignade (pas d'épandage à moins de 200m d'un lieu de baignade) (chambre d'agriculture du Cantal).

Actuellement il n'existe aucune norme concernant l'épandage de PROs non compostés. La norme NFU 44-051 régleme l'épandage d'amendements organiques compostés ou boues de STEP. D'après cette norme, le taux en indicateur de traitement, *E. coli* ne doit pas excéder 10^2 CFU/g de matière brute et les Salmonelles doivent être absentes dans 1g d'amendement, ou 25g d'amendement si celui-ci est utilisé en culture maraichère (AFNOR, 2006).

La norme NFU 44-095 s'applique aux amendements organiques compostés issus de boues de STEP. Cette norme place la concentration limite en indicateur de traitement *E. coli* à 10^4 CFU/g de matière brute. Concernant les valeurs limites pour les agents pathogènes, *L. monocytogenes* et *Salmonella* sp. doivent être absents dans 1g d'amendement et dans 25g si celui-ci est appliqué en culture maraichère (AFNOR, 2002).

C. Le déroulement du stage

1. Présentation du laboratoire

Le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de Narbonne est une unité de recherche INRA, rattachée au centre INRA de Montpellier. Ce laboratoire effectue depuis les années 80, des recherches dans le domaine de la digestion anaérobie. Plus précisément, les activités de recherche sont centrées sur la recherche et le développement de bioprocédés pour le traitement

d'effluents liquides et solides d'origine domestique, agricole et industriel. Grâce à l'alliance de diverses compétences (microbiologie, génie des procédés, mathématiques...), le LBE peut valoriser et développer des bioprocédés de transformation et de dégradation biologique des effluents et des déchets.

Le laboratoire était, jusqu'à 2015, composé de 4 objets thématiques :

- Ecologie Microbienne et Biodiversité (EMB), qui s'intéresse aux communautés microbiennes capables de dépolluer et/ou produire de l'énergie.
- Biofilm Mixte en réacteur (Biofilms), dont le but est de comprendre l'impact des paramètres environnementaux sur les biofilms et d'améliorer les réacteurs utilisant des biofilms.
- Biodisponibilité, Biodégradabilité et Co-traitements (Bio2Co), ayant pour objectif de comprendre et d'optimiser les processus de dégradation des matières organiques et des micropolluants.
- Ingénierie et Filière de Méthanisation (InFiMe), qui met en œuvre et optimise des réactions microbiennes afin de développer des procédés de dégradation de la matière organique.
- Transfert Technologique, dont le principal but est d'assurer le lien entre les recherches effectuées au LBE et le milieu industriel.

De plus, le LBE héberge 4 entreprises : BioEntech ; Ennesys ; Evea et Naskeo.

J'ai effectué mon stage au sein de l'objet thématique EMB, animé par Nathalie WERY.

2. Présentation et objectifs du stage

Ce sujet de stage s'inscrit dans le projet PRObiotic financé par l'ADEME. Ce projet est en partenariat avec le LBE de Narbonne et l'IRSTEA de Rennes. Ce projet a pour but de mieux comprendre l'influence des facteurs abiotiques (pH, température, biodégradabilité de la matière organique) mais surtout des facteurs biotiques (activité et diversité microbienne), sur la survie de microorganismes pathogènes au cours du stockage de PROs traités par méthanisation.

Le sujet de stage porte sur l'étude de la dynamique de 2 bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Derby) fréquemment retrouvées dans les effluents d'élevage. Plus particulièrement, les objectifs du stage sont (i) de suivre la persistance de *Listeria* sp. et de *Salmonella* sp. dans 9 PROs d'origine agricole inoculés en microcosmes, par des techniques de biologie moléculaire et (ii) de caractériser et comparer l'activité microbienne et la biodégradabilité de la matière organique de 13 PROs d'origine diverse (agricole, sites territoriaux ...).

II. Matériels et méthodes

A. Caractérisations physiques, microbiologiques et biochimiques des PROs

1. Les PROs de l'étude

Dans le cadre du projet PRObiotic, 30 PROs sont prélevés à la sortie de méthaniseurs traitants des déchets d'origines diverses (agricoles, ordures ménagères (OMR), boues de station d'épuration (STEP), territoriaux) sur tout le territoire français. Aussi, comme différentes phases peuvent être épandues, il a été prélevé du digestat brut ou la phase liquide ou solide après séparation de phase ou du digestat composté. Dans le cadre du stage, 13 PROs ont été prélevés : 3 PROs issus de déchets agricoles (Ferm11b, Ferm14S et Ferm14L), 8 PROs issus de sites territoriaux (Terri1R, Terri1b, Terri1S, Terri2S, Terri2L, Terri3S, Terri3L et Terri4S) et enfin 2 PROs issus de sites OMR (OMR1c et OMR1L). La provenance et la nature des PROs étudiés sont présentés dans le tableau A (annexe). Aussi, durant ce stage, j'ai pu participer au prélèvement du PRO Terri4S sur le site d'une unité de production de biogaz à Auch (32).

2. Les analyses physiques

a) Mesure du pH, de la matière sèche (MS) et de la matière volatile (MV)

Le pH est mesuré sur les 13 PROs étudiés selon la norme NF EN 15933 applicable aux boues de STEP, biodéchets traités et sols. Les PROs solides ayant des particules de tailles comprises entre 10-40 mm subissent un pré-traitement avant mesure du pH. Soixante mL de PROs solides (Ferm11b, Ferm14S, Terri1S, Terri2S, Terri3S et Terri4S) sont dilués dans 300 mL d'eau MiliQ, puis agités 1h et mis à décanter 1h avant d'être remis en suspension pour la mesure du pH. Le pH des PROs liquides (Ferm14L, Terri1R, Terri1b, Terri2L et Terri3L) est mesuré directement sans pré-traitement.

La matière sèche (MS) des 13 PROs est mesurée dans des creusets après séchage à 105°C pendant 48h (correspondant au temps nécessaire pour la stabilisation de la masse) afin d'éliminer l'eau. Seuls les composés organiques et inorganiques restent présents dans le creuset. La MS est calculée par différence de masses entre la masse brute et la masse séchée de l'échantillon. La matière volatile qui représente la teneur de l'échantillon en composés organiques, est ensuite mesurée après séchage à 550°C pendant 6 à 7h. Tous les composés organiques sont alors détruits et la différence entre la masse séchée à 105°C et celle après combustion à 550°C donne la quantité de matière volatile en gramme. Chaque mesure MS/MV est réalisée en duplicat biologique.

3. Mesure de la biodégradabilité anaérobie : tests de potentiel méthanogène(BMP)

La biodégradabilité de la matière organique des 13 PROs est mesurée par détermination du potentiel méthane (BMP) selon le protocole standardisé de la norme ISO 11734. Le test BMP permet de déterminer le volume maximal potentiel de méthane produit par un substrat organique lors de sa décomposition en anaérobiose par une flore microbienne complexe, exprimé dans des conditions

normales de température et de pression (0°C, 1013 hPa). Cette méthode est basée sur la mesure de la production de méthane par un réacteur fermé dans lequel sont mis en contact une quantité connue de l'échantillon à tester et une quantité connue de microorganismes anaérobies ; ces derniers étant placés dans des conditions favorables pour la dégradation de l'échantillon. Les tests BMP sont généralement réalisés sur les déchets afin de connaître leur production optimale de méthane. Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé des tests BMP sur chaque PROs afin d'avoir une idée de la stabilité de notre digestat. L'expérience est réalisée en fioles de 500 ml et en triplicat avec un témoin négatif contenant seulement l'inoculum. Il permettra de déterminer l'activité endogène du PRO. Chaque fiole BMP contient 4 ml de solution nutritive de macroéléments (NH₄Cl 26,6 g/L, KH₂PO₄ 10 g/L, MgCl₂ 6H₂O 6 g/L, CaCl₂ 2H₂O 3 g/L) et 4 ml de solution d'oligoéléments (FeCl₂ 4H₂O 2 g/L, CoCl₂ 6H₂O 0,5 g/L, MnCl₂ 4H₂O 0,1 g/L, NiCl₂ 6H₂O 0,1 g/L, ZnCl₂ 0,05 g/L, H₃BO₃ 0,05 g/L, Na₂SeO₃ 0,05 g/L, CuCl₂ 2H₂O 0,04 g/L, Na₂MoO₄ 2H₂O 0,01 g/L), 5-20 g de PROs selon le taux de MS/MV et 400 ml de boues biologiques comme inoculum à 2,5gMV/L. Les fioles BMP sont ensuite flushées à l'azote afin d'éliminer l'oxygène présent et sont incubées à 37°C sous agitation. Le test est arrêté lorsque la production cumulée de CH₄ atteint une asymptote. La composition du biogaz est ensuite analysée en GC-MS (GC-MS Clarus 480).

4. Caractérisation de la matière organique par fractionnement chimique séquentiel

La caractérisation de la matière organique est réalisée sur 9 PROs (Terr1b, Terri1S, Terri1R, Terri3L, Terri3S, OMR1C, Ferm11b, Ferm14L et Ferm14S) par fractionnement chimique selon le protocole développé au LBE (Muller *et al.*, 2014). Les extractions séquentielles permettent de fractionner la phase particulaire afin d'accéder à la matière organique soluble, puis à celle facilement extractible, et enfin à celle difficilement extractible. La méthode consiste en une extraction de type Van Soest avec 4 extractions par compartiment, suivie d'une étape finale d'extraction acide. Le détail de chaque fraction extraite est décrit dans la figure 2. Le fractionnement se réalise à partir de 0,5 g de PRO lyophilisé-broyé et en duplicat. La part de matière organique de chaque fraction est estimée par mesure de la demande chimique en oxygène (DCO).

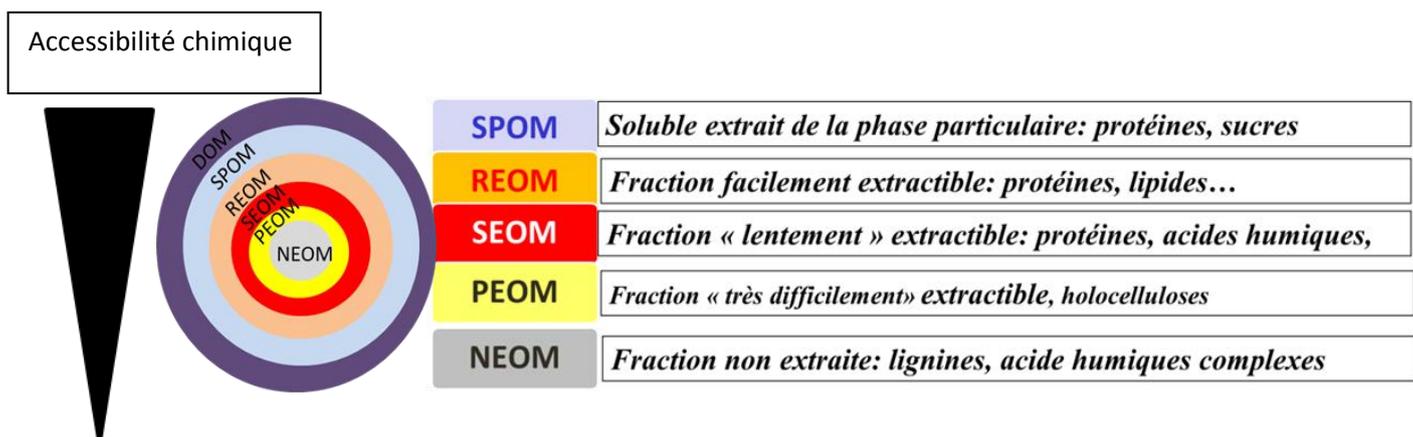


Figure 2 : description des différentes fractions de matière organique extraites par le protocole de fractionnement chimique séquentiel

5. Les analyses microbiologiques

a) Mesure du contenu en ATP par ATPmétrie

Le contenu en ATP est mesuré sur les 13 PROs par ATPmétrie. L'ATPmétrie constitue une réaction de bioluminescence utilisant le complexe enzymatique luciférase-luciférine. La lumière émise en RLU (Relative Light Unit) par la réaction enzymatique qui est proportionnelle à la quantité d'ATP présent dans l'échantillon est mesurée par un luminomètre (KIKKOMAN PD20N). Chaque PRO est dilué 40X dans de l'eau stérile. Le réactif contenant la luciférase (DENDRIDIAG® IW, GL Biocontrol) est ajouté à 50µl de PRO dilué. Cette première mesure est appelée R1. Ensuite, un ajout dosé d'ATP correspondant à 1000 pg d'ATP (DENDRIDIAG® IW, GL Biocontrol) est directement ajouté dans l'échantillon en question et permet de contrôler l'activité de l'enzyme dans le PRO. Cette deuxième mesure est appelée R2. La mesure est réalisée en triplicat biologique. La concentration en ATP dans le PRO est exprimée en pg d'ATP/g de matière brute. Pour obtenir le résultat, les opérations suivantes sont réalisées:

Calcul de l'ETALON (en pgATP/RLU) : $ETALON = R2 - R1 / 1000$

Calcul de la valeur de biomasse (en pgATP/ml) : $[ATP] = R1 / (ETALON * M)$

Avec : R1 = résultat sur l'échantillon en RLU après ajout de la luciférase, R2 = résultat sur échantillon + standard (ajout dosé) en RLU, ETALON = valeur de l'étalon en RLU/pgATP et M = prise d'essai initiale du PRO en gramme. La valeur R2 doit être environ 10 fois supérieure à R1 afin de contrôler que notre échantillon n'est pas inhibé.

Cette méthode est utilisée pour mesurer l'activité biologique liée à l'apport d'un compost sur un sol agricole (Gonçalves *et al.*, 2014 ; Tripathi, 2011)

b) Mesure de l'activité enzymatique par hydrolyse de la fluorescène di-acétate (FDA)

L'activité enzymatique est mesurée pour les 13 PROs par hydrolyse de la FDA. La FDA est un substrat qui peut être hydrolysé par différentes enzymes bactériennes de type hydrolases comme les lipases, protéases, estérases... La méthode consiste à mettre 10 ml de PRO dilué dans un tampon de potassium phosphate dibasique stérile à 60 mM (la dilution dépend de la couleur de l'échantillon, il faut que la DO à 490 nm du PRO dilué soit $< 0,8$), en présence de 50 μ l de FDA (solution stock à 2 mg/ml d'acétone). La réaction est incubée à 24°C pendant 1h et est ensuite stoppée avec l'ajout de 10 ml d'acétone. Après centrifugation (4500 rpm pendant 6 min), le surnageant est récupéré et la fluorescence est dosée au spectromètre à la DO 490 nm. Une gamme étalon avec des concentrations connues en FDA (de 0 à 10 μ g/ml) est réalisée de manière à construire une droite étalon et de déterminer la concentration en μ g de FDA/g de matière brute. La mesure est réalisée en triplicat biologique. Cette méthode est utilisée pour estimer l'activité microbienne de matrices pendant les processus de compostage (Ntougias *et al.*, 2006) ainsi que dans les sols (Schumacher *et al.*, 2015).

c) Mesure de l'activité microbienne résiduelle en anaérobiose

L'activité biologique résiduelle des 13 PROs est mesurée en batch de 500 ml, en duplicat et en condition anaérobie. Pour les PROs liquides, 400 ml de PRO est ajouté dans des fioles et pour les PROs solides, 200 g de PRO est mélangé à 200 ml de tampon bicarbonate à 2,5g/L afin de permettre une meilleure agitation. Les fioles sont ensuite flushées à l'azote afin d'éliminer l'oxygène présent et sont incubées à 37°C pendant 40 jours sous agitation. Les fioles sont suivies plusieurs fois par semaine, la quantité de biogaz produite est mesurée par la méthode de l'éprouvette renversée et la composition du biogaz est ensuite analysée en GC-MS (GC-MS Clarus 480). La quantité de CH₄ produit au cours du temps par les PROs ainsi que la quantité cumulée de CH₄, nous permettront d'avoir une idée de l'activité résiduelle qui reste dans les PROs.

d) Dénombrement de *E. coli* sur milieu TBX (indicateur de contamination fécale)

Pour chaque PRO, des mesures de contaminations fécales sont réalisées en ciblant *E. coli* sur une gélose spécifique ciblant une activité β -D-Glucuronidase (gélose TBX). Les PROs solides sont dilués 4 fois puis 10 fois dans de l'eau peptonée. Un mL des 2 dilutions est incorporé dans la gélose spécifique. Les PROs liquides sont dilués 10 fois et la dilution est incorporée dans la gélose. Les géloses inoculées sont ensuite incubées 20h à 44°C. Le dénombrement des colonies bleues traduit la présence d' *E. coli* ayant une activité β -D-Glucuronidase.

B. Suivi de la persistance de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Derby dans les PROs en microcosmes par des analyses moléculaires

1. Les PROs sélectionnés et la mise en place des microcosmes

a) Les Pros de l'étude

Dans le cadre du projet PRObiotic, 9 PROs (Ferm1c, Ferm5c, Ferm7c, Ferm2L, Ferm5L, Ferm7L, Ferm4b, Ferm9b et Ferm3b) parmi les 30 représentatifs de la filière de méthanisation à la ferme ont été sélectionnés pour une étude en microcosme. Les 9 PROs ont été choisis selon 3 critères susceptibles de jouer un rôle sur la biodégradabilité, l'accessibilité du substrat et sur l'activité de la microflore (temps de rétention, pourcentage de co-substrats végétaux en entrée et nature de la matrice épandue). Ces 9 PROs ont tous subi un traitement anaérobie mésophile en voie liquide, avec ou sans post-digestion. L'ensemble de leurs critères sont rapportés dans le tableau B (annexe).

b) La mise en place des microcosmes

Chaque PRO est inoculé avec *Listeria* ou *Salmonella* à des concentrations initiales de l'ordre de 10^7 - 10^8 CFU/ml, et ce en duplicat biologique. Les microcosmes sont incubés à 24°C pendant 41 jours dans des conditions simulant le stockage. Un mL de suspension bactérienne est ajouté à 100 g de PRO solide ou 125 ml de PRO liquide. Un flacon est réalisé par pathogène et par point de prélèvement pour les PROs solide et un seul flacon par échantillon pour tous les temps pour les PROs liquides. A chaque temps (0 ; 3 ; 7 ; 20 et 41 jours), 500 µl de PRO inoculés sont prélevés et conservés à -20°C pour des analyses futures. En parallèles de cette expérience, d'autres microcosmes ont été réalisés dans les mêmes conditions que décrites précédemment mais inoculés avec les pathogènes préalablement tués par sonication (8 min 360W) et chaleur (85°C, 10 min) afin d'évaluer le recyclage de l'ADN provenant de cellules mortes. Aux temps T0, 1, 2, 5, 7, 20 et 41 jours, 500 µl de PRO inoculés sont prélevés et conservés à -20°C pour des analyses futures.

Les microcosmes ont été mis en place avant le début du stage, j'ai cependant réalisé les extractions d'ADN et les quantifications en qPCR de *Salmonella* et de *Listeria* dans les 9 PROs de l'étude en microcosmes.

2. Quantification des bactéries pathogènes dans les microcosmes au cours du temps par analyses moléculaires

a) Extraction d'ADN

L'ADN de chaque microcosme (cellules vivantes et cellules mortes) est extrait selon le kit d'extraction d'ADN FastDNA SPIN Kit for Soil MP Bio (voir le protocole en annexe). La quantité et la qualité des ADNs extraits sont mesurées par spectrophotométrie (Infinite M200 Reader, NanoQuant, Tecan).

b) Quantification des bactéries pathogènes par qPCR

(1) Les souches bactériennes quantifiées

L. monocytogenes et *Salmonella* Derby sont quantifiées par qPCR en ciblant respectivement le gène *hlyA* codant pour un facteur de virulence et présent en simple copie dans le génome et le gène *invA* impliqué dans l'invasion et présent aussi en simple copie (Tableau 3).

Tableau 3 : Systèmes de qPCR utilisé pour quantifier *Listeria* et *Salmonella*

| espèce bactérienne | gène amplifié | référence |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>Salmonella</i> Derby | <i>InvA</i> (invasion) | Hoorfar <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>hlyA</i> (listériolysine) | Nogva <i>et al.</i> , 2000 |

(2) Protocole de qPCR selon le système Taqman

Pour une réaction, le mix est préparé dans un volume final de 20 µl en utilisant : 1µL d'amorce forward et 1µL d'amorce reverse à 200nM pour *hlyA* et 150nM pour *invA*, 1µL sonde Taqman® (marquées aux fluorochromes émetteur FAM en extrémité 5' et suppresseur TAMRA en 3') à 50nM pour *hlyA* et 100nM pour *invA* (décrites en annexe), 12,5µL de 2XSsoAdvancedUniversal Probes Supermix (Biorad), 4,5 µL d'eau et 5µL d'ADN précédemment extrait. Afin de contrôler la contamination de nos échantillons, 3 puits témoins sont réalisés, dans lesquels de l'eau est ajoutée à la place de l'ADN. La réaction d'amplification est réalisée sur le système qPCR biorad CFX96, en triplicat minimum et selon le programme suivant : 95°C 2 min (activation de l'enzyme), 40 cycles à 95°C 15 sec (dénaturation) et 58°C 1 min (hybridation et élongation).

Afin de quantifier le nombre de copies des gènes ciblés pour les 2 espèces de bactéries pathogènes, en nombre de copies par puits de PCR, une gamme de dilution avec un nombre connu de copies d'ADN a été utilisée. Des plasmides recombinants, contenant la séquence cible et dosés de 10^8 à 10^1 copies/puits, ont été utilisés pour construire la droite étalon. Les paramètres de la droite pour les 2 systèmes qPCR sont les suivants : pente de la régression linéaire entre -3,2 et -3,6, efficacité de la PCR entre 90-110% et le coefficient de corrélation (R^2) autour de 1.

Les données issues de la qPCR sont ensuite analysées avec le logiciel Bio-RAD CFX Manager. Le niveau de contamination, l'absence d'inhibition et l'efficacité de la gamme étalon sont vérifiés. Le CT (Threshold Cycle) qui correspond au nombre de cycles auxquels la réaction devient exponentielle est comparé au CT de la gamme étalon et est utilisé pour calculer le nombre de cycles par réaction de PCR. Les résultats de la qPCR sont convertis en nombre de copies/g de matière brute.

Les limites de quantification sont estimées à 50 copies/ μL d'ADN pour *Salmonella* Derby et 10 copies/ μL pour *L. monocytogenes* (soit environ 10^3 à 10^4 copies/g matière brute). Pour contrôler l'inhibition par des composés présents dans les échantillons, chaque ADN est amplifié à 2 dilutions avec 1 log de différence et en triplicat. La différence de signal entre les 2 dilutions doit être de 3,32 CT. Si cette différence est plus faible, l'échantillon est considéré comme inhibé. Des dilutions plus fortes sont réalisées pour palier à cette inhibition mais la limite de quantification est très vite atteinte (pour la dilution la plus forte). Dans ce cas, une autre méthode est utilisée, 1 μL /puits d'un contrôle positif interne (Primer PCR Positive Control Probe Assay, 5'HEX, 3' Iowa Black) est ajouté au mix PCR. Il permet de ne faire une seule dilution intermédiaire. Le CT obtenu pour chaque échantillon est comparé au CT du puits témoin contenant seulement le contrôle interne (sans ADN). Pour que l'échantillon soit accepté le nombre de cycles d'amplification devra être équivalent au témoin ($\pm 0,5$ CT).

C. Analyses statistiques

Les corrélations entre les paramètres d'activité biologique, de devenir de la matière organique mesurés et la survie des pathogènes étudiés en microcosmes sont analysées par analyse en composante principale (ACP) et analyses de corrélation (coefficient de Pearson) sous le logiciel RcmdR.

III. Résultats

A. Caractérisation des PROs du stage

1. Caractéristiques physico-chimiques

Parmi les 13 PROs étudiés, 3 proviennent de déchets agricoles (Ferm14L, Ferm14S et Ferm11b), 8 de déchets territoriaux (Terri1R, Terr1b, Terri1S, Terri2S, Terri2L, Terri3S, Terri3L et Terri4S) et 2 d'ordures ménagères (OMR1C et OMR1L). Leurs caractéristiques physico-chimiques (MS/M, pH et BMP) mesurées sont présentées dans le tableau 4. Les 13 PROs ont des pH neutres voir légèrement basiques, compris entre 7,9 et 8,9. Le taux d'humidité des PROs est supérieur à 40%. Les PROs bruts ont un taux d'humidité compris entre 79-93%, les phases solides entre 73-77%, les phases liquides ou rétentat entre 91-98% et enfin le digestat composté a 44% d'humidité. Ces gammes de pH et d'humidité ne sont pas défavorables à la croissance de bactéries pathogènes, cependant, quelques PROs s'approchent du pH maximum toléré par *Salmonella* sp., celui-ci étant de 9 (Terri1S, Terri2S et Terri3S). Les mesures de BMP faites sur les PROs représentent le potentiel méthane, c'est-à-dire le volume maximal de CH_4 produit par un substrat lors de sa dégradation par la flore microbienne complexe intervenant au cours du procédé de digestion anaérobie. Cette mesure est

normalement réalisée sur les déchets en entrée de méthanisation et permet d'estimer le taux de matière organique potentiellement biodégradable et donc le volume maximal de CH₄ que peuvent produire les déchets. Dans notre étude, cette mesure faite sur les digestats (en sortie de méthanisation) nous permettra de voir s'il reste de la matière organique biodégradable après traitement, et qui pourrait potentiellement engendrer une activité microbienne au cours du stockage. Les résultats de BMP sont disponibles sur seulement 5 PROs (Ferm11b, Ferm14S, Ferm14L, Terri1S et Terri2L). Pour ces PROs, les BMP sont compris entre 116 et 337 LCH₄/kg MV. Seul Ferm11b présente un BMP élevé proche de valeurs obtenues sur les déchets non méthanisés (337 LCH₄/kg MV). La mesure MS/MV permet d'avoir le taux de matière volatile (MV) correspondant à la matière organique potentiellement accessible. Celui-ci est plus élevé pour les matrices solides que liquides (< 15% pour les solides et >4% pour les liquides).

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des 13 PROs de l'étude

| PRO | pH | % MS | % MV | % humidité | BMP (LCH₄/kgMV) |
|------------|-----------|-------------|-------------|-------------------|-----------------------------------|
| Ferm11b | 8,39 | 20,44 | 15,09 | 79,56 | 337,66 |
| Ferm14L | 7,91 | 8,16 | 5,72 | 91,84 | 156,34 |
| Ferm14S | 8,65 | 25,6 | 22,14 | 74,4 | 271,18 |
| Terri1b | 8,26 | 6,42 | 4,71 | 93,58 | en cours |
| Terri1R | 8,57 | 1,65 | 0,92 | 98,35 | en cours |
| Terri1S | 8,74 | 23,86 | 17,73 | 76,14 | 139,48 |
| Terri2L | 8,45 | 5,57 | 3,14 | 94,43 | 116,14 |
| Terri2S | 8,87 | 24,89 | 19,94 | 75,11 | en cours |
| Terri3L | 7,93 | 6 | 3,77 | 94 | en cours |
| Terri3S | 8,75 | 26,37 | 21,76 | 73,63 | en cours |
| Terri4S | 8,68 | 22,80 | 13,91 | 77,2 | en cours |
| OMR1L | 8,33 | 2,69 | 1,52 | 97,31 | en cours |
| OMR1C | 8,63 | 55,77 | 23,5 | 44,23 | en cours |

C : PROs solides compostés, L : fraction liquide du digestat, S : fraction solide, b : digestat brut et R : rétentat d'ultrafiltration de la phase liquide

2. Caractérisation de la matière organique par fractionnement chimique séquentiel

L'accessibilité chimique des 9 PROs (Terri1b, Terri1R, Terri1S, Terri3S, Terri3L, OMR1C, Ferm11b, Ferm14L et Ferm14S) a été analysée par fractionnement chimique séquentiel, les résultats sont présentés dans le tableau 5. La part de la matière organique dissoute (DOM) fait partie de la fraction facilement accessible mais ne concerne que les échantillons sous forme liquide. En globalité,

la part de la fraction facilement accessible correspondant à la fraction soluble de la phase particulaire (SPOM) et à la fraction facilement extractible (REOM) (hors DOM) apparaît plutôt faible (< 10%), celle-ci ayant rapidement été dégradée par les microorganismes lors du traitement de digestion anaérobie. Ces fractions sont assimilées aux sucres, protéines et lipides non complexes.

Les PROs liquides ou rétentat (Terri1R et Ferm14L) ont une plus importante fraction de la matière organique qui est facilement accessible DOM comprise (>70%) par rapport aux PROs solides (<11%). Les PROs solides ont quant à eux une part de la fraction peu accessible correspondant à la fraction lentement (SEOM) et très lentement extractible (PEOM) plus importante (>35%) par rapport aux PROs liquides (<17%). Ces fractions sont assimilées aux protéines plus complexes, acides humiques et holocellulose. Terri1b, Terri1S, Terri3S, Terri3L, OMR1C et Ferm14S contiennent une grande fraction non extractible (> 45%) assimilé à la lignine ou à des acides humiques complexes. En effet, les PROs tels que Terri3 sont issus de déchets entrants contenant un fort pourcentage de fumiers ou lisiers ou co-substrats végétaux riches en lignine ou acide humique. Terri1b est un échantillon brut sous forme liquide, il contient donc une part de DOM non négligeable (19,4%) mais aussi un fort taux de fraction non extractible. De même, Terri3L semble être une exception parmi les matrices solides, de part une faible fraction soluble (11,6%) et un fort taux de fraction non extractible (63,1%), cela pourrait s'expliquer par la présence dans ce PRO de co-substrats végétaux (20%). En conclusion nous voyons que les fractions liquides possèdent un part beaucoup plus élevée de fraction facilement accessible de la matière organique par rapport aux PROs solides, cela est dû au traitement de séparation de phase. Les matières peu liées (correspondant à des molécules simples, type sucres et protéines) se retrouvent sous formes dissoutes dans la part liquide, alors que les éléments plus fortement liés (correspondant à des molécules complexes de types acides humiques, celluloses) restent dans la part solide.

Tableau 5 : Caractérisation biochimique de la matière organique par fractionnement chimique

| PROs | Fraction soluble (%DOM) | fraction facilement accessible | | fraction peu accessible | | fraction non extractible (%NEOM) |
|---------|-------------------------|--------------------------------|--------|-------------------------|--------|----------------------------------|
| | | % SPOM | % REOM | % SEOM | % PEOM | |
| Terri1b | 19,4 | 4,86 | 3,01 | 7,65 | 16,82 | 48,27 |
| Terri1R | 120,84 | 2,53 | 0,36 | 0,45 | 1,28 | 0 |
| Terri1S | 0 | 4,09 | 3,62 | 11,12 | 24,78 | 56,39 |
| Terri3L | 11,6 | 1,9 | 1,7 | 9,1 | 12,6 | 63,1 |
| Terri3S | 0 | 3 | 2,2 | 8 | 40,3 | 46,5 |
| OMR1C | 0 | 2,1 | 2,2 | 6,8 | 29,7 | 59,2 |
| Ferm11b | 0 | 4,09 | 3,54 | 11,59 | 70,24 | 10,55 |
| Ferm14L | 69,06 | 5,52 | 2,7 | 6,81 | 10,86 | 5,06 |
| Ferm14S | 0 | 6,56 | 4,08 | 11,27 | 32,92 | 45,17 |

3. Caractérisation microbiologique

a) *Activité microbienne*

Trois méthodes ont été utilisées pour mesurer une activité biologique au sein des PROs.

L'activité enzymatique aspécifique est mise en évidence par l'hydrolyse de la fluoresceine di-acétate (FDA), ciblant des enzymes de types hydrolases. Cette mesure est réalisée en triplicats biologiques. Les résultats de l'activité enzymatique ainsi que les écarts-types sont présentés dans la figure 3. Les fractions solides et compostés des PROs ont une activité enzymatique plus importante (comprise entre 150 et 450µg de FDA hydrolysée/g de matière brut) que les fractions liquides et brutes des PROs (compris entre 50 et 150µg de FDA hydrolysée/g de matière brut). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les échantillons solides contiennent une forte fraction de matière organique peu et non extractible (> 90%), correspondant notamment à de la cellulose, hémicellulose, lignine ou acide humique. Ceci nécessite donc une mobilisation enzymatique importante pour leur dégradation. A l'exception de Terri2S qui présente une activité enzymatique plus faible. Aussi, Terri3L semble faire exception, il présente une activité enzymatique comparable aux matrices solides. En effet ce PRO contient une forte proportion de substrats végétaux par rapport aux autres phases liquides de digestats. Les PROs territoriaux et OMR semblent globalement avoir une activité enzymatique plus importante que les PROs de fermes. Ceux-ci contiennent en effet une plus grande variété de matrices (boues, déchets agro-alimentaires, graisses, végétaux, fumier...) alors que les déchets agricoles ne contiennent souvent que des déchets de type fumier/lisier et parfois des co-substrats végétaux. Cette plus grande variété de substrats des PROs territoriaux et d'OMR pourrait expliquer une mobilisation enzymatique plus importante

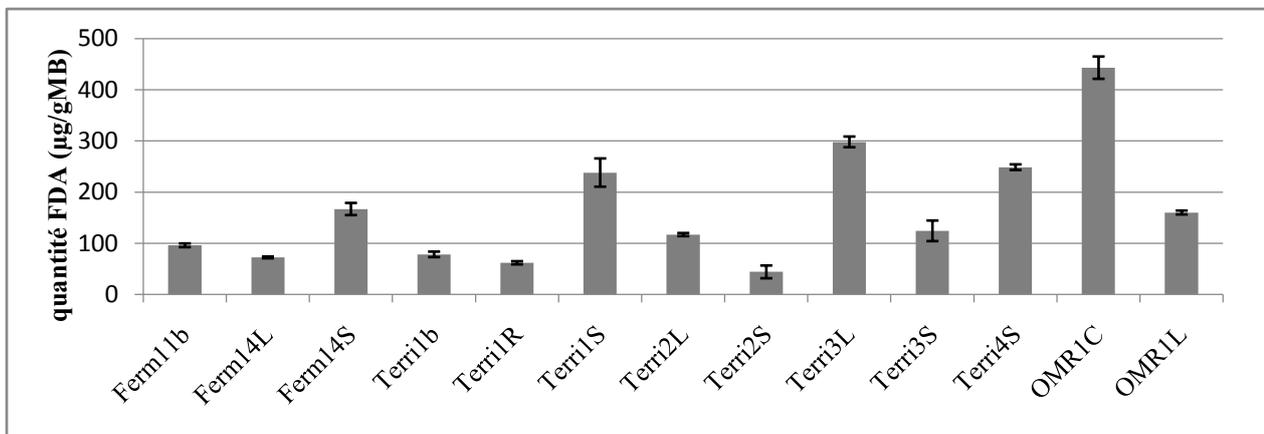


Figure 3 : activité enzymatique aspécifique des 13 PROs de l'étude mesurée par hydrolyse de la fluoresceine di-acétate et exprimée en microgrammes de FDA hydrolysée par gramme de matière brute. L'expérience est réalisée en triplicats biologiques et les écart-types sont représentés sur la figure pour chaque PRO.

Le contenu en ATP a été mesuré par ATPmétrie sur les 13 PRO de l'étude, en triplicat biologiques pour chaque PRO. Cette mesure peut être reliée à une activité biologique totale selon Horiuchi *et al.* (2003). La figure 4 présente le contenu en ATP en picogrammes d'ATP par gramme de matière brut dans les 13 PROs ainsi que les écart-types pour chacun. Les PROs liquides, à l'exception de Ferm14L, ont un contenu en ATP beaucoup plus important ($>8,00E+07$) que les PROs solides et bruts ($< 5,00E+07$). Cela peut s'expliquer par le fait que ce sont des matrices liquides qui contiennent la part de fraction de matière organique facilement accessible la plus importante, cela offrira donc aux microorganismes une source de nutriments facilement et rapidement assimilables. Cependant, il est difficile de comparer les contenus en ATP des matrices compostées aux autres, celles-ci étant colonisées par des communautés microbiennes très différentes (moisissures notamment).

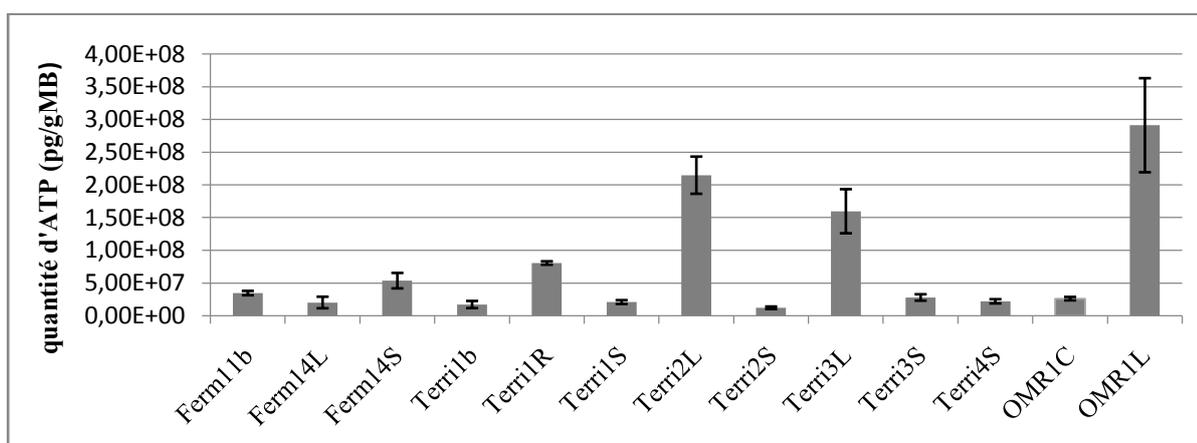


Figure 4 : contenu en ATP total de 13 PROs de l'étude mesuré par ATPmétrie et exprimée en picogrammes d'ATP par gramme de matière brute. L'expérience a été réalisée en triplicat biologique et les écart-types sont représentés sur la figure.

L'activité microbienne résiduelle est mesurée par la production de CH₄ en condition anaérobie. Les quantités de CH₄ produites par les PROs permettront d'avoir une idée de l'intensité de l'activité résiduelle des microorganismes présents dans chaque PRO. Le tableau 6 présente la production cumulée de CH₄ sur 40 jours. Les PROs liquides ou rétentat, à l'exception de Terri2L, produisent plus de CH₄ (entre 103,69 et 177,15 LCH₄/kgMV) que les PROs solides (entre 55,07 et 93,75LCH₄/kgMV). Cela peut être relié au fait que les microorganismes survivent mieux dans les matrices plus humides, et surtout que ce sont dans ces matrices que la part de matière organique facilement accessible était la plus importante, ce qui fournit des conditions de développement plus favorables aux microorganismes.

Tableau 6 : activité microbienne résiduelle (cumul de CH₄ après 40 jours de stockage) mesurée dans des conditions anaérobies. Les valeurs montrées correspondent à la moyenne de duplicat biologique.

| PROs | Cumul CH ₄ (LCH ₄ /kgMV) |
|---------|---|
| Ferm11b | 177,15 |
| Ferm14S | 93,75 |
| Ferm14L | 103,69 |
| Terri1b | 70,21 |
| Terri1S | 66,49 |
| Terri1R | 122,42 |
| Terri2S | 55,07 |
| Terri2L | 66,06 |

Les figures 5a et 5b présentent les 2 types de cinétiques de production de CH₄ au cours du temps : cinétique de type 1 (figure 5a) et de type 2 (figure 5b). Dans le cas de la cinétique de type 1, il y a un pic de production de CH₄, dès T₀ et qui augmente jusqu'à des volumes de 6 à 11 litres de CH₄ puis redescend rapidement après 10 jours (à des volumes inférieurs à 4 litres de CH₄). Ce pic en début d'expérience, correspond à une dégradation rapide de la matière organique facilement accessible, retrouvée en quantité importante dans ces matrices liquides par les microorganismes anaérobies. Puis cette vitesse devient plus faible et plus constante lorsque la matière organique se stabilise. La cinétique de type 1 concerne des échantillons qui étaient sous forme liquide (Ferm14L, Terri1R et Terri1b) et avait une part de matière organique facilement accessible importante (>25%). Seul Terri1S fait exception, il contient une faible part de matière organique facilement accessible (7,71%). Dans le cas de la cinétique de type 2, la vitesse de dégradation augmente lentement les 5

premiers jours puis est constante tout au long de l'expérience (entre 2 et 4 L CH₄ produit/j/kg MV entre jour 5 et jour 30) enfin le volume produit diminue successivement les 10 derniers jours de l'expérience (< 2 litres de CH₄). Cette cinétique concerne des matrices exclusivement solides, contenant une part importante de matière organique peu accessible et stabilisée, la dégradation par les microorganismes sera donc plus difficile et plus lente. La cinétique de type 2 concerne des matrices solides (Terri2S, Ferm11b et Ferm14S) ayant une faible part de matière organique facilement accessible (< 11%). Concernant Ferm11b, l'activité résiduelle semble anormalement élevée, cela peut être dû au fait que ce PRO est peu stabilisé (problèmes lors de la montée en température dans le digesteur d'après l'exploitant).

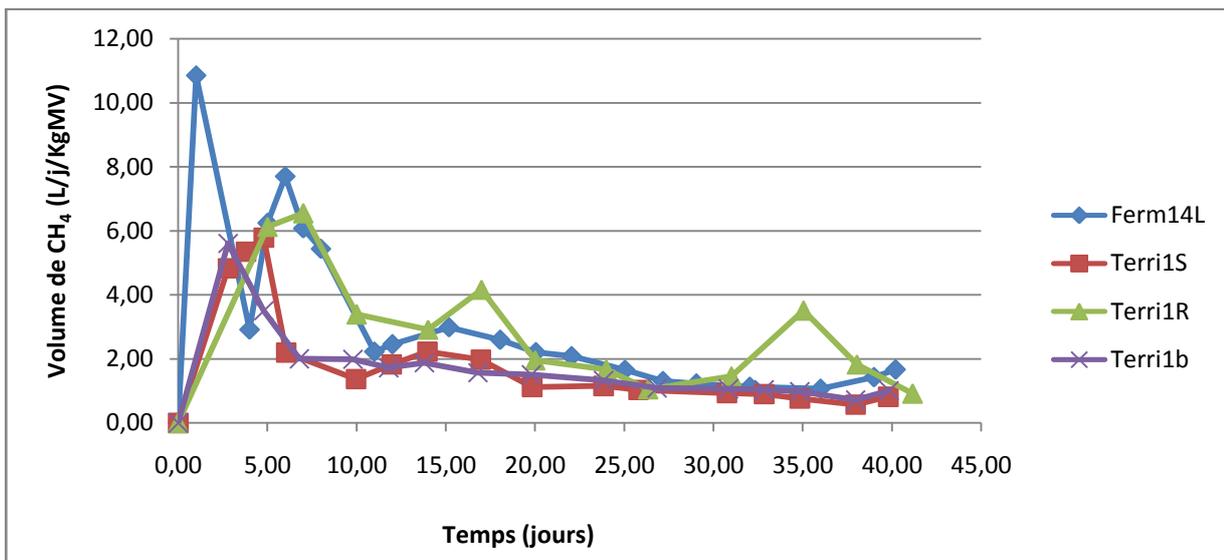


Figure 5a : cinétique 1 montrant la vitesse de production de CH₄ au cours du temps dans les fioles d'activité résiduelle.

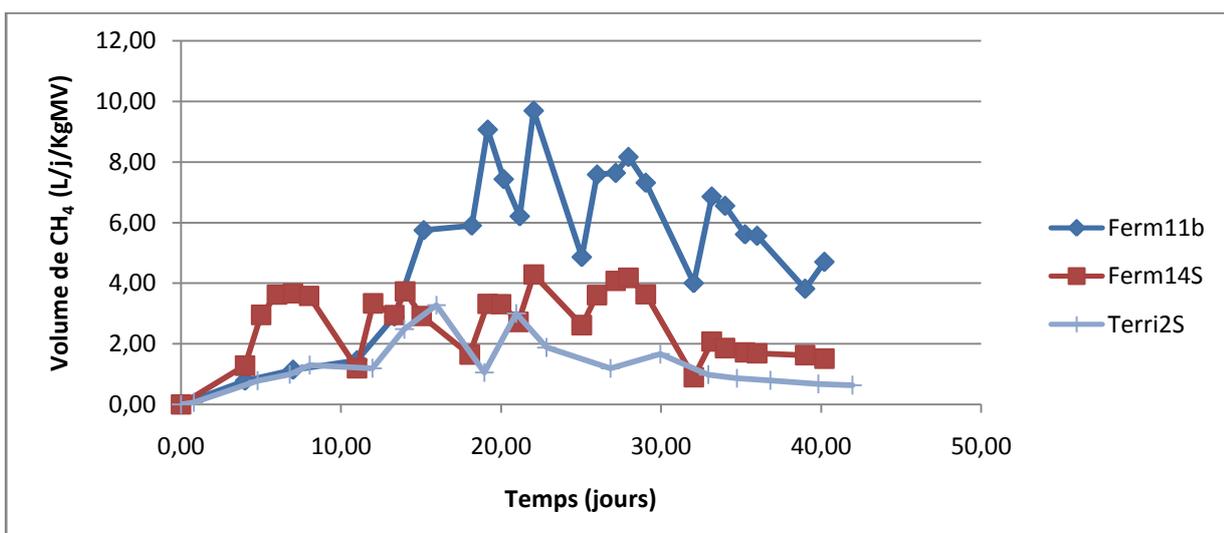


Figure 5b : Cinétique 2 montrant la vitesse de production de CH₄ au cours du temps dans les fioles d'activité résiduelle.

b) Dénombrement de *E. coli* (indicateur de contamination fécale)

La concentration de *E. coli* dans un échantillon est un indicateur du taux de contamination fécale. Il permet d'estimer si le traitement des PROs (digestion anaérobie et éventuels traitement de séparation de phase et/ou compostage) ont permis d'éliminer les contaminants microbiologiques. Les PROs agricoles (Ferm11b, Ferm14S et 14L) ont des concentrations en *E. coli* importantes (>200UFC/gMB) de même pour les PROs Terri3 et OMR1 (>100UFC/gMB). Les autres PROs Terri1 et Terri2 sont peu voir non contaminés en *E. coli* (<15 UFC/gMB). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats, la composition du déchet en entrée du PRO (présence ou non de matières fécales), l'efficacité du traitement ou encore les conditions de stockage du PRO (cf discussion).

Tableau 6 : Dénombrement de *E. coli* sur milieu TBX, exprimé en nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) par grammes de matière brute (MB)

| PROs | <i>E. coli</i> (UFC/gMB) |
|---------|--------------------------|
| Ferm11b | 2,84E+02 |
| Ferm14S | 2,84E+03 |
| Ferm14L | 2,30E+05 |
| Terri1b | 0,00E+00 |
| Terri1S | 1,48E+01 |
| Terri1R | 0,00E+00 |
| Terri2S | 0,00E+00 |
| Terri2L | 0,00E+00 |
| Terri3S | 1,33E+02 |
| Terri3L | 1,26E+02 |
| Terri4S | 0,00E+00 |
| OMR1C | 2,22E+03 |
| OMR1L | 1,74E+04 |

B. Suivi de la persistance de *Listeria* sp. et *Salmonella* sp. dans les PROs en microcosmes par des analyses moléculaires

Le suivi de la persistance de *L. monocytogenes* et *Salmonella* Derby est étudiée en qPCR, pour 9 PROs suivis en microcosmes dans lesquels ont été inoculés indépendamment les 2 pathogènes à des concentrations d'environ 10^7 - 10^8 UFC/mL. L'expérience est réalisée en duplicat biologique pour chaque PRO. Aussi, des microcosmes contenant les pathogènes préalablement tués ont été

réalisés dans les mêmes conditions que les microcosmes cellules vivantes afin d'observer le recyclage de l'ADN provenant de cellules mortes. Les dynamiques de survie de *L. monocytogenes* et *Salmonella* Derby, dans les différents PROs sont estimées par l'évolution du nombre de copies d'ADN par gramme de matière brute. Avant mon arrivée, les microcosmes cellules vivantes ont aussi été suivis par des méthodes de cultures. Les pathogènes ont été dénombrés sur des géloses spécifiques ciblant *Listeria* ou *Salmonella*. Les données de qPCR seront donc comparées aux données recueillies par la culture. Cette étude à l'échelle du laboratoire permettra d'avoir une idée de la survie de ces bactéries pathogènes au cours du stockage.

Les dynamiques de survie des 2 pathogènes dans les microcosmes sont présentées sur la figure A en annexe et quelques exemples sont présentés dans la figure 6. Les graphiques représentent l'abattement au cours du temps des pathogènes, défini par le logarithme de la concentration à un temps t divisé par la concentration au temps initial ($\text{Log}(C/C_0)$). Les duplicats étant très répétables, ce sont les moyennes qui sont représentées.

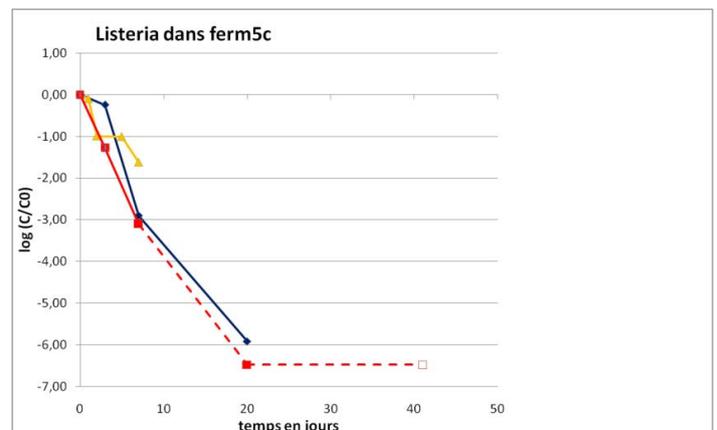
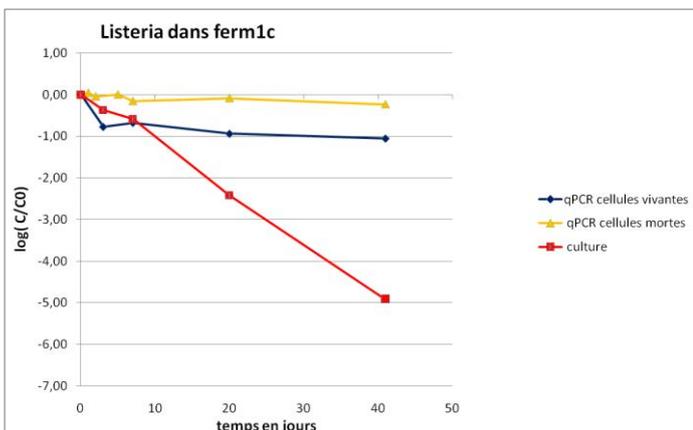
Globalement pour l'ensemble des PROs, pour les cellules vivantes étudiées en qPCR, il est observé un abattement des pathogènes au cours du temps. Celui-ci est au minimum de 0,5 log et au maximum de 4 log en 7 jours (sauf Ferm4b et Ferm5L pour *Listeria*, pas d'abattement). Concernant *Salmonella*, il est observé généralement un abattement fort des cellules vivantes pouvant atteindre entre 1-4 log en seulement 7 jours. De plus *Salmonella* n'est plus quantifiée dans aucun PRO après 20 jours (exemple de Ferm5c, figure 6). Concernant *Listeria*, l'abattement des cellules vivantes est beaucoup plus faible, il est généralement inférieur à 1 log en 7 jours. Aussi, *Listeria* est souvent quantifiée après 20 voir 41 jours (pour tout les PROs sauf Ferm7c, Ferm9b et Ferm7L) (exemple de Ferm4b, figure 6). Il est donc mis en évidence un effet bactérie, la survie est dépendante de l'espèce considérée. *Listeria* semble survivre beaucoup plus longtemps dans les PROs que *Salmonella*. La survie de *Listeria* semble dépendante de la matrice, elle survie mieux dans les matrices liquides et brutes (abattement inférieur à 0,5 log en 7 jours) que dans les matrices compostées, à l'exception de Ferm1c (abattement supérieur à 1,5 log en 7 jours).

La qPCR réalisée sur les microcosmes cellules mortes permet de vérifier si l'ADN est recyclé et à quelle vitesse. Deux dynamiques peuvent être observées pour *Salmonella*, soit (i) l'abattement des cellules mortes est beaucoup plus rapide que pour les cellules vivantes, c'est le cas de Ferm5c (2,5 log en 2 jours vs 0,2 log en 3 jours) ; 7c (2 log en 2 jours vs 0,5 log en 3 jours) ; 7L (1,5 log en 2 jours vs 0,5 log en 3 jours) et 9b (2 log en 2 jours vs 0,5 log en 3 jours). L'ADN est donc considéré comme rapidement recyclé dans ces matrices (exemple de Ferm5c, figure 6). (ii) Pour les PROs Ferm1c ; 2L (figure 6) ; 4b ; 3b et 5L, l'abattement des cellules mortes est équivalent ou inférieur aux cellules vivantes. L'ADN semble donc peu ou pas recyclé dans ces matrices. Les PROs Ferm1c

(figure 6) et Ferm4b constituent des cas particuliers, les cellules mortes persistant beaucoup mieux que les cellules vivantes. Concernant le recyclage de l'ADN pour *Listeria*, un seul type de dynamique est observé. L'abattement des cellules mortes est souvent équivalent voir inférieur aux cellules vivantes (à l'exception de Ferm5L). Quelques soit la matrice, l'ADN de *Listeria* semble se recycler très lentement ou pas de tout (exemple de Ferm4b, figure 6).

En mettant en lien les résultats de qPCR cellules vivantes, qPCR cellules mortes et le dénombrement par culture, 3 cas sont observés :

- Les cellules vivantes persistent mieux que les cellules mortes (vitesse de recyclage de l'ADN supérieure à la vitesse d'abattement) et l'abattement en culture est supérieur à l'abattement en qPCR cellules vivantes. Dans ce cas, la vitesse de recyclage de l'ADN est rapide, la qPCR permet de quantifier des cellules vivantes. La comparaison avec la culture met en évidence des états VBNC (*Listeria* : Ferm2L (figure 6) et Ferm5L ; *Salmonella* : Ferm7c, Ferm5c (figure 6) et Ferm9b).
- La vitesse de recyclage de l'ADN est équivalente ou inférieure à la vitesse d'abattement des cellules en qPCR et l'abattement en culture est supérieur à l'abattement en qPCR. La qPCR ne peut pas être utilisée pour quantifier des cellules vivantes. (*Listeria* : Ferm1c, Ferm7c, Ferm4b (figure 6) et Ferm7L ; *Salmonella* : Ferm1c, Ferm4b, Ferm2L (figure 6))
- L'abattement des cellules en qPCR et en culture est équivalent et la vitesse de recyclage de l'ADN est équivalente à la vitesse d'abattement. Dans ce cas le recyclage de l'ADN est lent mais ce qui est quantifié en qPCR correspond bien à des cellules vivantes. Il n'y a pas de passage à l'état VBNC (*Listeria* : Ferm5c (figure 6) et Ferm7L ; *Salmonella* : Ferm7L ; Ferm3b et Ferm5L (figure 6)).



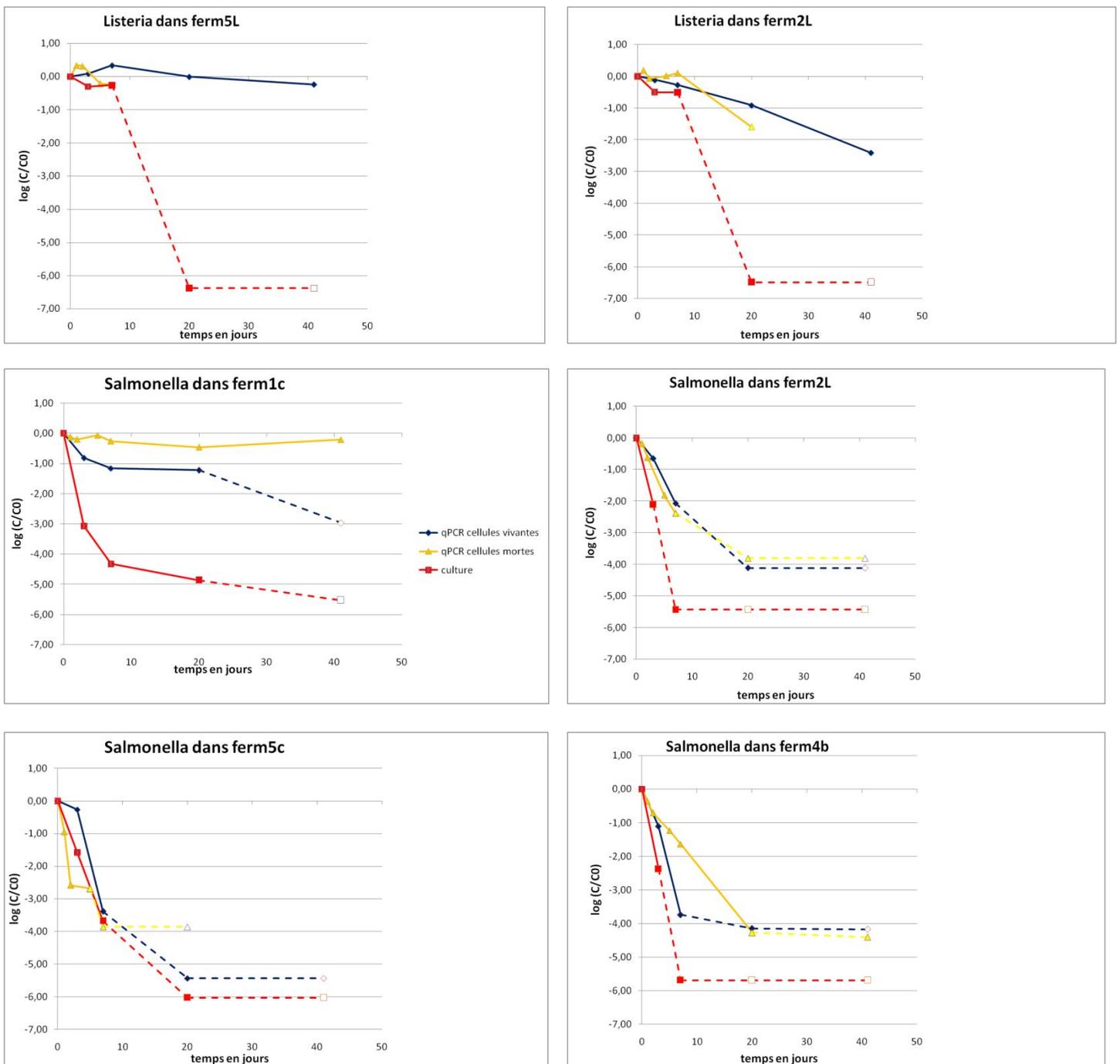


Figure 6 : vitesse d'abattement de *Listeria* et *Salmonella* en microcosmes dans les 9 PROs. Les courbes en pointillées représentent les points en limite de quantification.

C. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sous le logiciel Rcmdr ont été réalisées d'une part afin de valider nos observations faites sur la caractérisation physico-chimique, biochimique et microbiologique des 13 PROs étudiés du cours du stage. Et d'autre part, ces analyses ont été effectuées sur les 9 PROs étudiés en microcosmes pour mettre en évidence des relations entre la caractérisation des 9 PROs (données non acquises pendant le stage, tableau F en annexe) et l'abattement de *Listeria* et

Salmonella mesurés par qPCR. Ces analyses ont été étudiées grâce à des matrices de corrélation (coefficient de Pearson) et des analyses en composante principale (ACP). On considère que 2 facteurs sont corrélés lorsque le coefficient de corrélation est supérieur ou égal à plus ou moins 0,7.

Concernant la caractérisation des 13 PROs étudiés au cours du stage, différentes corrélations peuvent être mises en évidence entre les paramètres mesurés (ACP présentée en figure 7, matrice de corrélation dans le tableau C en annexe). L'activité résiduelle anaérobie est négativement corrélée à la fraction non extraite de la matière organique, ce qui confirme nos observations, ce sont les PROs avec le taux de fraction non extraite la plus importante (Terri1b, Terri1S, Ferm14S > 45%) qui ont une activité résiduelle anaérobie la plus faible. L'humidité est aussi positivement corrélée à la fraction facilement accessible de la matière organique, confirmant les résultats obtenus. Les matrices liquides ont la part de fraction facilement accessible la plus importante (Terri1R, Ferm14L, Terri3L : >15%). L'activité enzymatique aspécifique (hydrolyse de la FDA) est positivement corrélée à la fraction non extraite, ce qui permet d'appuyer nos résultats, puisque ce sont les matrices solides, ayant la fraction non extraite la plus importante (Ferm14S, Terri1S et OMR1C : >45%) qui avait une activité enzymatique la plus importante. Enfin l'activité enzymatique est aussi négativement corrélée à l'humidité, ce qui était observé dans nos résultats puisque les PROs liquides (ayant un pourcentage d'humidité supérieur à 90%) qui ont une activité enzymatique la plus faible.

Concernant les relations entre l'abattement de *Salmonella* et *Listeria* dans les microcosmes étudiés en qPCR et la caractérisation des 9 PROs associés, différentes corrélations peuvent être mises en évidence. L'abattement à T3 et T7 jours ont été choisis pour réaliser ces analyses statistiques. Le résultat de l'ACP est présenté dans la figure 8 (les matrices de corrélation à T3 et T7 sont présentées dans les tableaux D et E en annexe). L'abattement de *Listeria* à T3 est négativement corrélé avec l'humidité, cela coïncide avec les résultats observés en qPCR, *Listeria* survie mieux dans les matrices liquides. L'abattement de *Listeria* à T7 est positivement corrélé à la part de la fraction peu accessible de la matière organique, or il a été mis en évidence, que *Listeria* avait un abattement plus fort dans les matrices solides, et d'après nos résultats, ces matrices possèdent une part de fraction peu accessible importante. Enfin, l'abattement de *Salmonella* à T7 est positivement corrélé au contenu en ATP (et donc à l'activité microbienne). La survie des 2 bactéries semble être déterminée par des facteurs différents, la survie de *Listeria* semble être influencée par des facteurs abiotiques (pourcentage d'humidité et caractéristiques biochimiques de la matière organique) tandis que la survie de *Salmonella* semble elle influencée par des facteurs biotiques (activité microbienne).

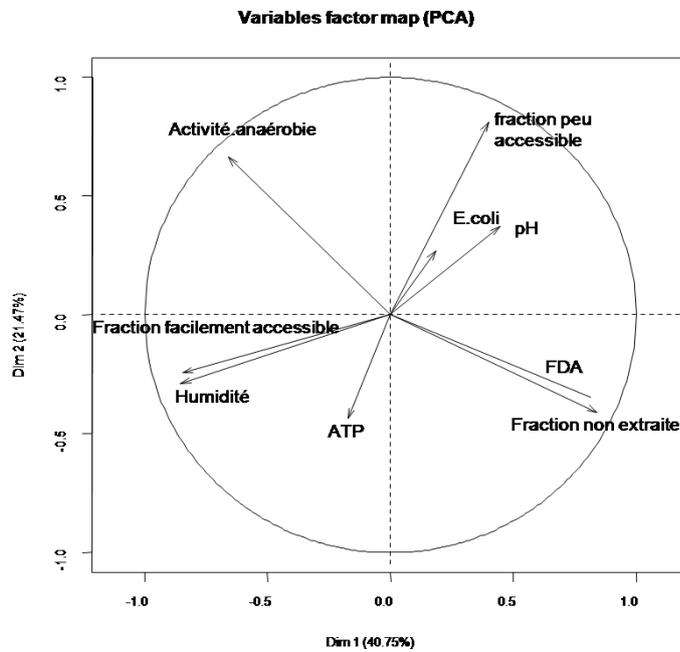


Figure 7 : Résultat de l'analyse en composante principale (ACP) des différents facteurs étudiés sur les 13 PROs de l'étude. (FDA = activité enzymatique aspécifique ; ATP = activité microbienne totale ; activité anaérobie = activité microbienne résiduelle anaérobie ; fraction facilement/peu accessible/ non extraite = accessibilité de la matière organique)

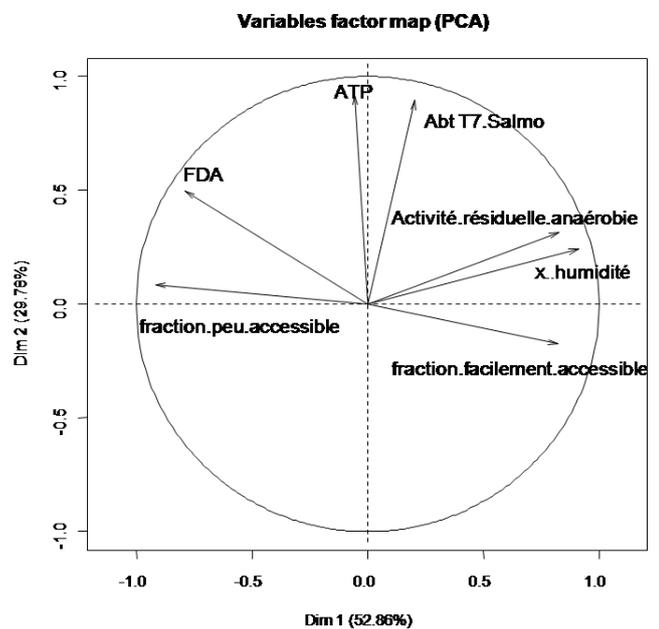
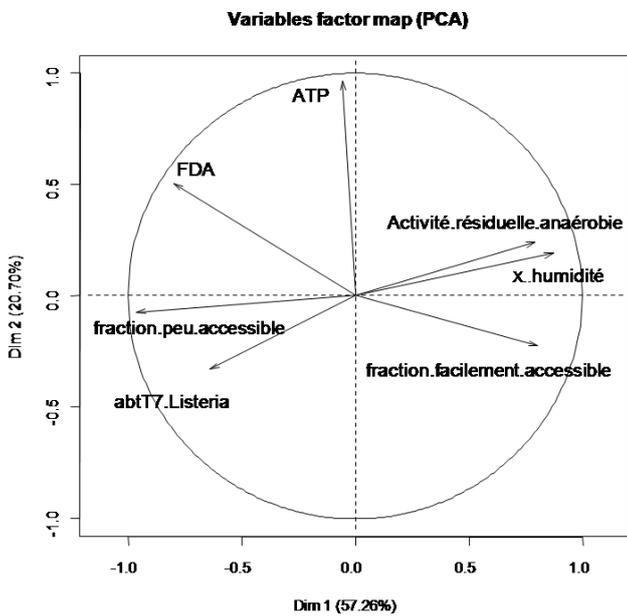


Figure 8 : résultats de l'analyse en composante principale de l'abattement de *Listeria* et *Salmonella* à T7 avec les différents facteurs mesurés. (FDA = activité enzymatique aspécifique ; ATP = activité microbienne totale ; activité anaérobie = activité microbienne résiduelle anaérobie ; fraction facilement/peu accessible/ non extraite = accessibilité chimique de la matière organique ; abt = abattement)

IV. Discussion

Dans un contexte actuel où la question des ressources en énergie et du recyclage des déchets est de plus en plus importante, le procédé de méthanisation apparaît comme une alternative très intéressante. En effet, il permet la production de biogaz mais aussi d'un digestat qui pourra être utilisé comme amendement organique lors d'épandage au champs. L'aspect sanitaire du digestat est donc très important. Ces digestats peuvent être stockés à durées variables et dans différentes conditions avant d'être épandus. Pendant ce laps de temps une évolution du nombre de microorganismes pathogènes (qui avait été réduits par le traitement de méthanisation) peut être observée. Il est donc important de s'intéresser aux facteurs, qui, au cours du stockage, influencent la survie des pathogènes. Dans cette optique, ce stage s'est focalisé sur l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques sur la survie de 2 bactéries pathogènes (*Listeria* et *Salmonella*).

Le choix de l'étude de la persistance de *Listeria* et *Salmonella* en microcosmes, simulant les conditions de stockage, sur des matrices agricoles, se justifie par le fait que ce sont ces 2 pathogènes qui sont retrouvés le plus fréquemment dans les effluents agricoles. Selon l'étude de Pourcher *et al.* (2012), sur 44 effluents d'élevage en Bretagne, il a été montré que plus de 50% étaient contaminés par *Salmonella* et plus de 20% par *Listeria*.

La persistance de ces 2 bactéries au cours du temps a été analysée par qPCR. Le choix de cette méthode s'explique par ses nombreux avantages, c'est une méthode rapide, sensible, spécifique et automatisée (Wolffs *et al.*, 2005). La qPCR, en comparaison à la culture, nous a permis de mettre en évidence des états viables mais non cultivables (VBNC) pour les 2 pathogènes dans différentes matrices. Selon l'étude de Klein *et al.* (2011) lorsqu'ils ont quantifié *Listeria* en culture et en qPCR, dans des microcosmes de compost de fumier, il a été observé au maximum une quantification quatre fois plus importante en qPCR par rapport à la culture pour un microcosme, pour les autres autour de deux fois plus. Cela met en évidence une concentration importante du pathogène sous état VBNC. Il est donc important de pouvoir quantifier ces états VBNC, ces bactéries pouvant, en conditions favorables, sortir de cet état et engendrer une recroissance. Cela représente un facteur de risque qu'il est important de prendre en compte (Klein *et al.*, 2011). Malgré les nombreux avantages apportés par la qPCR, cette technique a néanmoins ses limites. Dans notre étude nous avons, en plus de l'étude de la survie des pathogènes, voulu regarder la vitesse de recyclage de l'ADN (par inoculation de pathogènes morts en microcosmes). Cette expérience, permet de voir si l'ADN relargué par les cellules mortes est recyclé rapidement et donc si ce qui est quantifié par qPCR correspond bien à des cellules vivantes. Or, il a été observé dans certains PRO (tel que Ferm2L, Ferm3b et Ferm5L, Ferm1c et Ferm4b) pour *Salmonella* et tous les PROs pour *Listeria* (sauf Ferm5L) que la vitesse de recyclage

de l'ADN était équivalente ou inférieure à la vitesse d'abattement des cellules vivantes. Dans ce cas, il apparaît impossible de savoir si ce qui est quantifié correspond ou non à des cellules vivantes. Ce même type d'observation a déjà été mis en évidence par Wolffs *et al.* (2004). Dans cette étude, les auteurs suivent la persistance de différents pathogènes, inoculés en microcosmes, dans des matrices alimentaires. Ils ont remarqué qu'il était possible d'avoir des faux positifs en qPCR, dû à un signal positif provenant de l'ADN des cellules. Afin de le démontrer, ils ont inoculé en microcosme les pathogènes préalablement tués et ont observé la vitesse de recyclage de l'ADN. Ils ont remarqué que la vitesse de recyclage de l'ADN pouvait être très lente, engendrant des faux signaux positifs en qPCR. L'une des hypothèses les plus probantes pouvant expliquer ce recyclage très lent, est que l'ADN pourrait être adsorbé sur des particules présentes dans nos échantillons, ce qui le protégerait de la dégradation par les désoxyribonucléases (DNases). Il a été précédemment démontré par Blum *et al.* (1997), que la persistance de l'ADN extracellulaire dans les sols s'expliquait par l'adsorption de l'ADN sur des particules du sol, les protégeant ainsi de la dégradation par les DNases. Cette observation a été confirmée par Levy-booth *et al.* (2007), qui ont montré que l'ADN extracellulaire pouvait s'adsorber rapidement sur des substances humiques ou minérales du sol. Une autre hypothèse serait que la microflore endogène du PRO serait très peu active, excréant peu de DNases, d'où un recyclage de l'ADN extracellulaire très lent. Deux cas particuliers sont ressortis dans notre étude, le cas de Ferm1c (pour *Salmonella* et *Listeria*) et Ferm4b (*Salmonella*). Pour ces 2 PROs, la vitesse de recyclage de l'ADN est beaucoup plus lente que la vitesse d'abattement des cellules vivantes. Dans les microcosmes cellules mortes, l'ADN persiste mais dans les microcosmes cellules vivantes celui-ci est recyclé plus rapidement. L'une des hypothèses, pourrait être que dans ces matrices, la microflore endogène est très peu active (ou en faible proportion) entraînant un faible taux en DNases. L'ADN des cellules mortes ne serait donc pas dégradé. Or dans les microcosmes cellules vivantes, les cellules encore vivantes de *Salmonella* ou *Listeria*, pourrait excréter des DNases capables de dégrader l'ADN des cellules mortes. Ferm1c est une matrice très sèche, plutôt défavorable à une activité microbienne endogène, d'où un recyclage lent de l'ADN.

La qPCR semble être une méthode efficace pour la quantification de cellules vivantes dans différentes matrices et permet la quantification de VBNC. Elle présente donc un avantage par rapport à la culture. Cependant cette méthode n'est fiable que dans la mesure où l'ADN des cellules mortes est rapidement recyclé, c'est pourquoi les méthodes de quantification doivent être encore optimisées.

Dans notre étude, la qPCR est utilisée pour étudier la dynamique de survie de *Salmonella* et *Listeria* en microcosme. Cette expérience a permis de mettre en évidence un abattement de ces 2 bactéries au cours du temps. La vitesse ainsi que l'importance de cet abattement semblent dépendantes de l'espèce bactérienne. Ainsi *Listeria* persiste longtemps dans les microcosmes,

contrairement à *Salmonella*. Cette persistance accrue de *Listeria* a précédemment été démontrée dans des eaux usées et des effluents agricoles (type fumier). Dans ces matrices, il a été observé une survie, au cours du stockage, de trois mois pour *Salmonella* et de plus de six mois pour *Listeria*. Ces différences peuvent s'expliquer par la capacité de *Listeria* à croître à des gammes de température et pH très larges, permettant de résister aux fluctuations environnementale (Nicholson *et al.*, 2005). De plus c'est une bactérie capable de résister à de nombreux stress (choc osmotique, thermique, dessiccation ...), ce qui lui permet de survivre plus longtemps en condition de stress (Pourcher *et al.*, 2012). La dynamique de survie serait donc relative à l'espèce considérée mais elle est aussi sous la dépendance de différents facteurs biotiques et abiotiques. Nous avons vu précédemment que *Listeria* semblait mieux survivre dans les PROs bruts et liquides, qui sont très humides (>88% d'humidité, tableau F en annexe) que dans les PROs compostés plutôt secs (< 60% d'humidité, tableau F en annexe). Ce lien entre la survie de *Listeria* et le taux d'humidité a été confirmé en analyse en composante principale (ACP) et analyse de corrélation. L'abattement de *Listeria* à T3 jours étant négativement corrélé au pourcentage d'humidité. Peu de données sont retrouvées dans la littérature concernant l'influence de l'humidité sur la survie de *Listeria* dans les matrices type compost ou digestat. Néanmoins Pietronave *et al.* (2004), ont montré, lors d'une étude sur des composts, que l'humidité serait un des facteurs abiotiques les plus importants dans la survie des pathogènes. Ils ont montré que la survie des pathogènes n'était possible qu'à un pourcentage d'humidité supérieur à 80%. L'une des autres relations qu'a fait ressortir notre étude, est le lien entre la survie de *Listeria* et le devenir de la matière organique. L'abattement de *Listeria* est positivement corrélé à la part de la fraction peu accessible de la matière organique riche en protéines complexes, acides humiques et cellulose, ce sont dans les matrices compostées (Ferm1c, Ferm5c et Ferm7c) que l'abattement le plus important et le plus rapide de *Listeria* a été observé. Les matrices compostées ayant subi en plus de la digestion anaérobie, une étape de digestion aérobie (compostage), la matière organique est plus stabilisée d'où une part plus importante de la fraction peu accessible de la matière organique (>40%, tableau F en annexe). Il a été démontré que plus un compost est mature (donc contenant une matière organique stabilisée et moins disponible) moins les bactéries pathogènes survivaient (Paniel *et al.*, 2010). La survie de *Salmonella*, quant à elle, ne semble pas dépendre du type de matrices (liquide, brute, compostée). Les analyses statistiques ont fait ressortir une relation entre la survie de *Salmonella* et le contenu en ATP d'une matrice donnée. Plus le contenu en ATP est élevé, moins *Salmonella* survie. Le contenu en ATP mettant en évidence une activité microbienne totale, montre que plus la microflore endogène est active moins *Salmonella* survie. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. L'existence de compétition pour la ressource en nutriments entre le pathogène et la microflore endogène, la production de substances antimicrobiennes ou encore la prédation par des espèces eucaryotes. Plusieurs études ont démontré un lien entre la survie de

Salmonella et la microflore endogène. Notamment l'étude de Pietronave *et al.* (2004), qui a mis en évidence que la grande variété de groupes microbiens endogènes dans des composts de boues de STEP et fumier, favorisait la compétition avec *Salmonella* pour la ressource de nutriments. Aussi, les actinomycètes et champignons présents dans ces matrices produisent des substances antimicrobiennes. Ces observations ont été confirmées par Paniel *et al.* (2010), qui ont montré que la diminution des pathogènes dans le compost était liée à la microflore endogène en limitant la disponibilité des nutriments et produisant des substances antimicrobiennes.

L'étude en microcosme fait sur des PROs de type ferme a permis de faire ressortir les facteurs biotiques et abiotiques ayant une influence sur la survie des 2 pathogènes *Listeria* et *Salmonella*. Nous avons donc, parallèlement à cette étude, regarder comment se comportaient ces différents facteurs biotiques et abiotiques dans des PROs issus de différents types de déchets (boues de STEP, OMR, déchets territoriaux). Afin de voir comment évolueraient les pathogènes dans ces matrices. Il est donc possible de faire le lien entre les 13 PROs sur lesquels ont été effectuées les mesures des paramètres biotiques et abiotiques avec les PROs étudiés en microcosmes. Les caractéristiques physiques (pH, humidité) sont équivalentes, offrant des conditions favorables à la croissance des microorganismes. De mêmes pour la caractérisation de la matière organique, les mêmes résultats sont observés avec une tendance liquide/solide (fraction facilement accessible plus importante pour les matrices liquides). Les seules différences observées concernent l'activité résiduelle et le contenu en ATP qui sont légèrement plus élevés dans les 13 PROs étudiés. Cela pourrait traduire une activité plus importante de la microflore endogène, susceptible d'avoir une influence sur la survie des pathogènes dans ces PROs.

La contamination en *E. coli* est utilisée comme indicateur de la contamination fécale d'un échantillon. Certain PROs étaient fortement contaminés alors que dans d'autres aucune colonie n'a été dénombrée. Deux hypothèses peuvent être apportées, cette contamination est-elle endogène au PRO ? La matrice avant traitement était peut être fortement contaminée par *E. coli*, c'est ce qui est retrouvé pour les PROs agricoles (Ferm14, Ferm11), or les effluents agricoles type fumier contiennent de 10^2 à 10^6 CFU/g de *E. coli* (Pourcher *et al.*, 2012). De même, le PRO Terri3 est aussi contaminé, celui-ci contient des boues de STEP. Il a été montré que les boues de STEP peuvent contenir des concentrations en *E. coli* jusqu'à 10^4 CFU/g (Pourcher *et al.*, 2012). Ces concentrations élevées en entrées pourraient expliquer que le traitement n'a pas entièrement éliminé la contamination, causant un redéveloppement au cours du stockage. Une seconde hypothèse concerne les conditions de stockage, les PROs stockés à l'air libre sont susceptibles d'être exposés à des matières fécales extérieures (type fientes d'oiseaux ou fèces de rongeurs) apportant une

contamination en microorganismes fécaux type *E. coli*. Cette possibilité de contamination au cours du stockage a notamment été démontrée par Paniel *et al.* (2010).

Cette étude a permis de mettre en évidence la dynamique de survie de 2 bactéries pathogènes dans des PROs de type agricole au cours du stockage. Cela a fait ressortir les principaux facteurs biotiques tels que l'activité microbienne, et abiotiques tels que l'humidité et le devenir de la matière organique, ayant une influence sur cette survie. Le comportement de ces différents facteurs a été étudié dans des PROs d'origines diverses. La connaissance du comportement de ces facteurs dans les différentes matrices permettra d'envisager comment les pathogènes pourraient se comporter dans celles-ci. Ces connaissances offrent l'opportunité de mieux contrôler les différents paramètres au cours du stockage, afin de minimiser les risques engendrés par les pathogènes lors de leur épandage futur.

Cependant, il aurait pu être intéressant d'étudier directement le comportement des pathogènes en microcosmes dans différents types de PROs, et pas uniquement dans des PROs type agricole, afin d'avoir une vision réelle du comportement des pathogènes.

Des perspectives peuvent être envisagées dans la continuité de ce projet. Notamment, il serait intéressant de déterminer si la contamination en *E. coli* est endogène ou provient de contaminants extérieurs. Il existe une méthode permettant de révéler la source d'une contamination bactérienne. Cette méthode est le « microbial source tracking ». Spécifiquement à *E. coli*, la méthode la plus pertinente est le « fecal source tracking ». Certaines toxines de *E. coli* sont hôtes spécifiques, le but de cette méthode est donc d'utiliser des biomarqueurs spécifiques des gènes de ces toxines et de regarder leur prévalence par qPCR. Il existe actuellement des biomarqueurs spécifiques de porcs, oiseaux, humains, bovins, chiens et lapins (Jiang *et al.*, 2007).

La seconde perspective serait de trouver un moyen de pallier aux faux signaux positifs obtenus en qPCR. L'une des méthodes serait la quantification de l'ADN de nos cellules par RT-qPCR (Dever *et al.*, 2004), l'ARN étant plus instable que l'ADN, il est très rapidement dégradé lorsqu'il se retrouve en dehors des cellules. L'étude de l'ARN permettrait de ne quantifier que les cellules vivantes. Cependant cette instabilité est l'un des freins de cette méthode, de nombreuses précautions sont à prendre notamment lors de la manipulation de l'ARN. Une autre méthode possible serait la quantification des cellules vivantes par cytométrie en flux, un marquage live/dead (type kit BacLight) pour séparer le vivant du mort (Berney *et al.*, 2007) puis un second marquage par un anticorps couplé à la fluorescence d'un antigène spécifique des pathogènes que l'on souhaite quantifier (Veal *et al.*, 2000). Enfin la dernière méthode qui pourrait être envisagée serait de traiter nos matrices avec un agent intercalant type EMA (ethidium monoazide) capable de pénétrer dans les bactéries mortes et de s'intercaler dans l'ADN et le cliver, mais incapable de pénétrer dans les

bactéries vivantes. Cela permet donc une quantification par qPCR seulement des cellules vivantes ayant un ADN intact (Soejima *et al.*, 2007). Le défaut majeur de ces 2 dernières techniques est qu'elles sont difficilement applicables à des matrices complexes.

V. Bibliographie

ADEME. Traitements biologiques, pp.1-6. [en ligne] disponible sur : <http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?catid=15555>.

AFNOR, 2002. Amendement organiques, compost contenant des matières d'intérêt agronomique, issu du traitement des eaux. NF U44-095, pp.1-24.

AFNOR, 2006. Amendements organiques, dénomination, spécification et marquage. NF U44-051, pp.1-17

ANSES, 2011. *Salmonella spp.* Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, pp.1-4. [en ligne] disponible sur : <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Fi-Salmonellaspp.pdf>.

Apesa, 2007. Méthanisation et production de biogaz Etat de l'art., pp.1–37.

Arthurson, V., 2008. Proper sanitization of sewage sludge: A critical issue for a sustainable society. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), pp.5267–5275.

Avery, L.M., Anchang, K.Y., Tumsweige, V., Strachan, N. & Goude, P.J., 2014. Potential for pathogen reduction in anaerobic digestion and biogas generation in Sub-Saharan Africa. *Biomass and Bioenergy*, pp.1-13.

Bagge, E., Sahlström, L. & Albihn, A., 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research*, 39(20), pp.4879–4886.

Bastide, G., ADEME, 2014. Méthanisation. Fiche technique, pp.1-19. [en ligne] disponible sur : http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/document/expertsie_dechets_-fiche_technique_methanisation.pdf

Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.U. & Egli, T., 2007. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE / DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), pp.3283–3290.

Besson, M., 2010. La méthanisation en zones AOC Savoyardes, Connaissance et maîtrise des aspects sanitaires liés à l'épandage de digestat. Rapport de stage, Licence Professionnelle COMESA, Université de Savoie, pp.1-37.

Blum, S.A.E., Lorenz, M.G. & Wackernagel, W., 1997. Mechanism of Retarded DNA Degradation and Prokaryotic Origin of DNases in Non sterile Soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(4), pp.513–521. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80021-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80021-5).

- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. & Swaminathan, B., 2000. Guest Commentary, *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), pp.2465–2467.
- Chambre d’agriculture du Cantal. Epannage des lisiers et fumiers : les distances aux cours d’eau. [en ligne] disponible sur : <http://www.cantal.chambragri.fr/pages-hors-menu-internet/chroniques-juridiques/environnement-eau/epandage-des-lisiers-les-distances-aux-cours-deau-01082014.html>.
- Devers, M., Soulas, G. & Martin-Laurent, F., 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), pp.3–15.
- Energies renouvelables, 2009. Le biogaz et sa production. [en ligne] disponible sur : http://www.energies-renouvelables-fr.com/Le-biogaz-et-sa-production_a50_3.html.
- Fablet, C., Robinault, C., Jolly, J.P., Dorenlor, V., Eono, F., Labbe, A., Fravolo, P. & Madec, F., 2007. Etude de la contamination du lisier de porcs par *Salmonella enterica* dans 69 élevages bretons. *Journées Recherche Porcine*, (1), pp.431–432.
- Feng, F., Goto, D. & Yan, T., 2010. Effects of autochthonous microbial community on the die-off of fecal indicators in tropical beach sand. *Microbial Ecology*, 74, pp.214–225.
- Frederic, S., Méthanisation.info. Besoins nutritionnels. [en ligne] disponible sur : <http://www.methanisation.info/besoins.html>.
- Gonçalves, I., Araujo, A., Nunes, L. & De Melo, J., 2014. Acta Scientiarum Soil microbial biomass after two years of the consecutive application of composted tannery sludge. *Acta Scientiarum Agronomy*, pp.35–41.
- Heinonen-Tanski, H., Mohaibes, M., Karinen, P. & Koivunen, J., 2006. Methods to reduce pathogen microorganisms in manure. *Livestock Science*, 102(3), pp.248–255.
- Hoorfar, J., Arhens, P. & Radstrom, P., 2000. Automated 5’ nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), pp.3429-3435.
- Horan, N.J., Fletcher, L., Betmal, S.M., Wilks, S.A. & Keevil, C.W., 2004. Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Research*, 38(5), pp.1113–1120.
- Horiuchi, J., Ebie, K., Tada, K., Kobayashi, M & Kanno, T., 2003. Simplified method for estimation of microbial activity in compost by ATP analysis. *Bioresource Technology*, 86, pp.95–98.

- Jiang, S.C., Chu, W., Olson, B.H., He, J.W., Zhang, J., Le, J.Y. & Gedalanga, P.B., 2007. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp.927–934.
- Klein, M., Brown, L., Ashbolt, N.J., Stuetz, R.M. & Roser, D., 2011. Inactivation of indicators and pathogens in cattle feedlot manures and compost as determined by molecular and culture assays. *Microbiology Ecology*, 77, pp.200–210.
- Lemunier, M., Francou, C., Rousseaux, S., Houot, S., Dantigny, P., Piveteau, P. & Guzzo, J., 2005. Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), pp.5779–5786.
- Levy-booth, D.J., Campbell, R.J., Gulden, R.H., Hart, M.M., Powell, J.R., Pauls, K.P., Swanton, C.J., Trevors, J.T. & Dunfield K.E., 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, pp.2977–2991.
- Manyi-Loh, C.E., Manphweli, S.N., Meyer, E.L., Okoh, A.I., Makaka, G. & Simon, M., 2013. Microbial anaerobic digestion (bio-digesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), pp.4390–4417.
- Moletta, R., 2008. La méthanisation. Tec et Doc. Paris : Lavoisier, pp.1-532. ISBN : 978-2-7430-1036-2.
- Muller, F., ADEME, 2011. Qualité agronomique et sanitaire des digestats. *Rapport de l'ADEME*, pp.1-250.
- Nicholson, F.A., Groves, S.J. & Chambers, B.J., 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96, pp.135–143.
- Nogva, H.K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A., Lillehaug, D., 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and pasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), pp.4266-4272.
- Ntougias, S., Ehaliotis, C., Papadopoulou, K. & Zervakis, G., 2006. Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. *Biology and Fertility of Soils*, pp.330-337.
- Orgaterre, 2004. La qualité agronomique des digestats. *Synthèse Solagro*, n°2, pp.1-17.

- Paavola, T. & Rintala, J., 2008. Effects of storage on characteristics and hygienic quality of digestates from four co-digestion concepts of manure and biowaste. *Bioresource Technology*, 99(15), pp.7041–7050.
- Paniel, N., Rousseaux, S., Gourland, P., Poitrenaud, M. & Guzzo, J., 2010. Assessment of survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Infantis* and *Enterococcus faecalis* artificially inoculated into experimental waste or compost. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), pp.1797–1809.
- Pietronave, S., Fracchia, L., Rinaldi, M. & Martinotti, M.G., 2004. Influence of biotic and abiotic factors on human pathogens in a finished compost. *Water Research*, 38, pp.1963–1970.
- Pourcher, A.M., Ziebal, C., Kervarrec, M., Bioteau, T. & Dabert, P., 2012. Sanitary status of 44 hog manure in Brittany : Comparison of the effectiveness of manure treatments based on the level of indicator bacteria and two pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural Science and Technology*, A2, pp.303-313.
- Rocourt, J. & Buchriesser, C., 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* : phylogenetic position, taxonomy and identification. In Ryser, E & Marth, E., *Listeria*, listeriosis and food safety. Third edition. CRC Press, pp.1-12.
- Russ, C.F. & Yanko, W.A., 1981. Factors affecting salmonellae repopulation in composted sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(3), pp.597–602.
- Schumacher, T.E., Eynard, A. & Chintala, R., 2015. Rapid cost-effective analysis of microbial activity in soils using modified fluorescein diacetate method. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, pp.4759–4762.
- Sidhu, J., Gibbs, R.A., Ho, G.E. & Unkovich, I., 2001. The role of indigenous microorganisms in suppression of *Salmonella* regrowth in composted biosolids. *Water Research*, 35(4), pp.913–920.
- Soejima, T., Iida, K.I., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., Takade, A. & Yoshida, S.I., 2007. Photoactivated Ethidium Monoazide Directly Cleaves Bacterial DNA and Is Applied to PCR for Discrimination of Live and Dead Bacteria. *Microbiology Immunology*, 51(8), pp.763–775.
- Tripathi, B.D., 2011. Earth Science & Climatic Change A Short Term Study on Toxic Effects of Distillery Sludge Amendment on Microbiological and Enzymatic Properties of Agricultural Soil in a Tropical City. *Earth Science and Climatic Change*, 2(1), pp.1–8.
- Vanotti, M.B., Millner, P.D., Hunt, P.G. & Ellison, A.Q., 2005. Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment. *Bioresource Technology*, 96(2), pp.209–214.

- Vázquez-boland, J.A., Kunh, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, D., Goebel, W., Gonzales-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J., 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Review*, 14(3), pp.584–640.
- Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. & Attfield, P.V., 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), pp.191–210.
- Velge, P., Cloeckaert, A. & Barrow, P., 2004. Emergence of *Salmonella* epidemics : the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteridis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 34(1), pp.267–288.
- Watcharasukarn, M., Kaparaju, P., Steyer, J.P., Krogfeld, K.A. & Angelidaki, I., 2009. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as indicator organisms in evaluating pathogen-reducing capacity in biogas plants. *Microbial Ecology*, 58(2), pp.221–230.
- Wolffs, P., Norling, B. & Peter, R., 2005. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 60, pp.315–323.

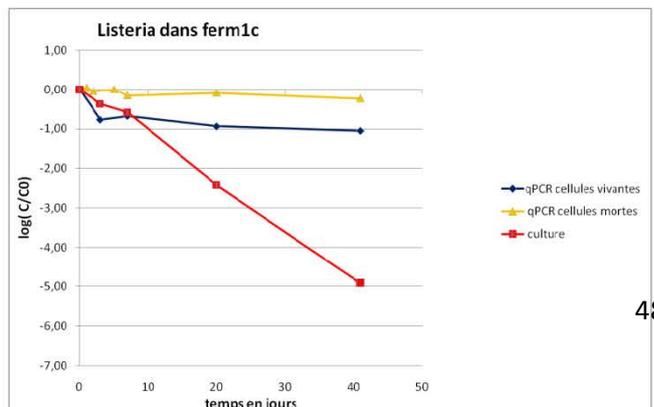
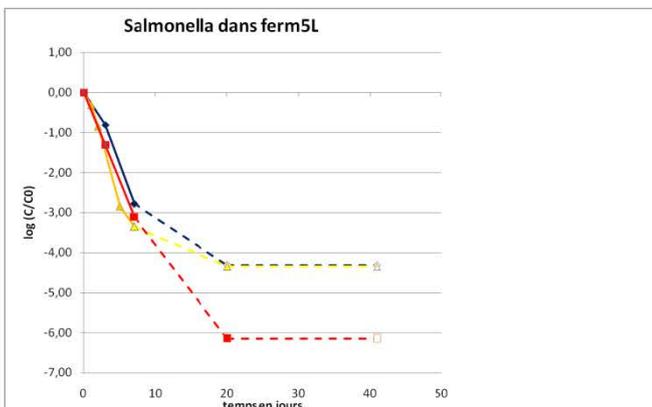
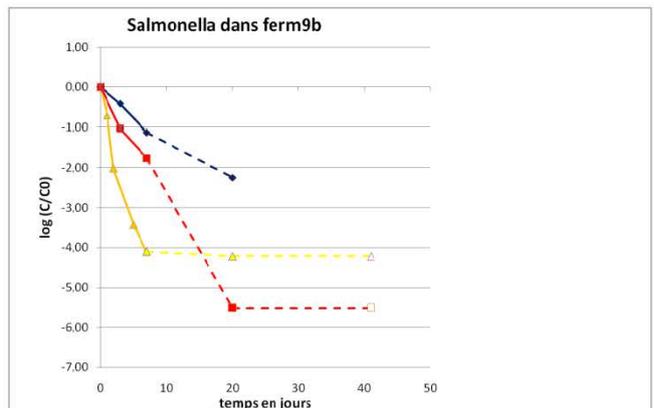
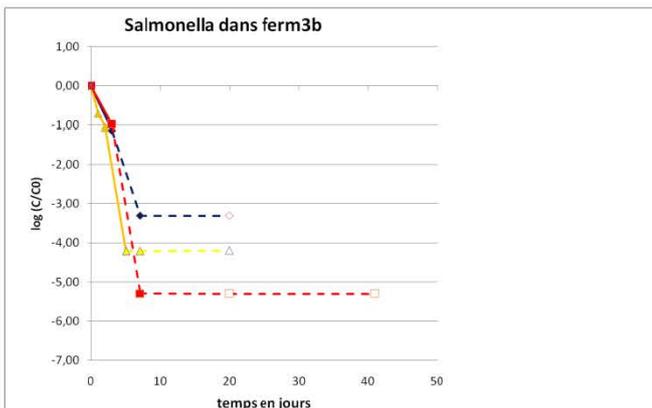
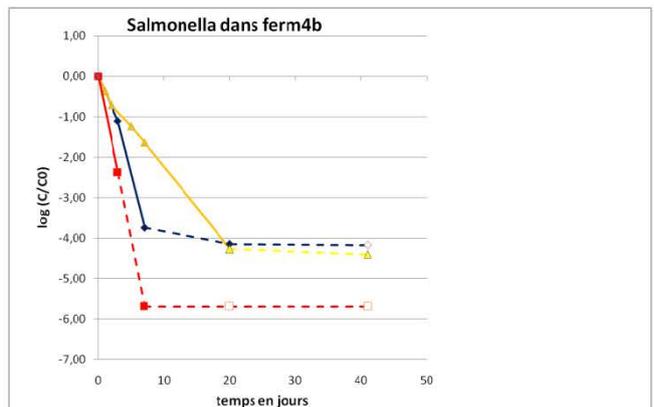
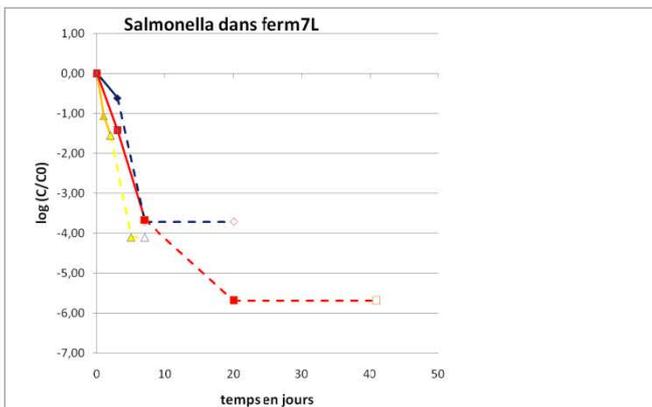
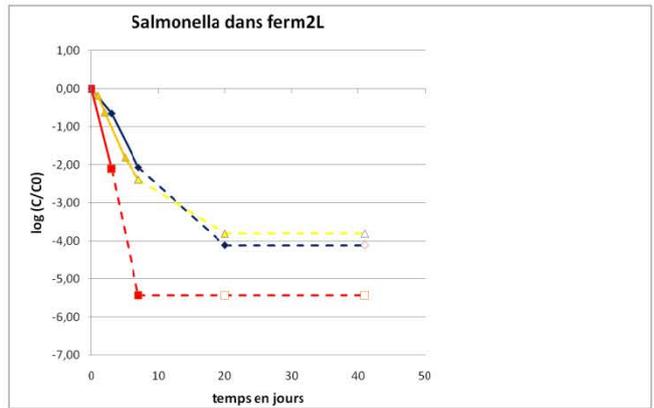
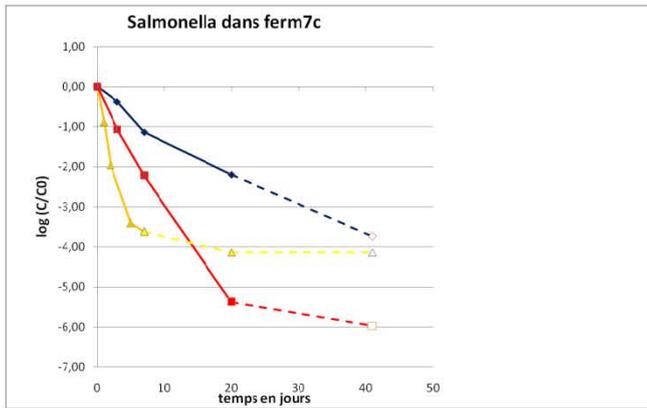
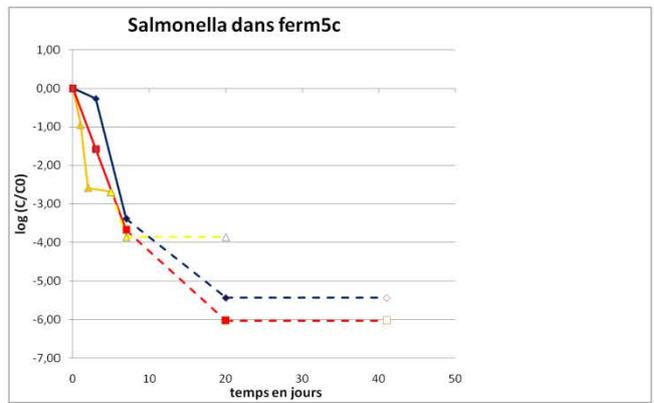
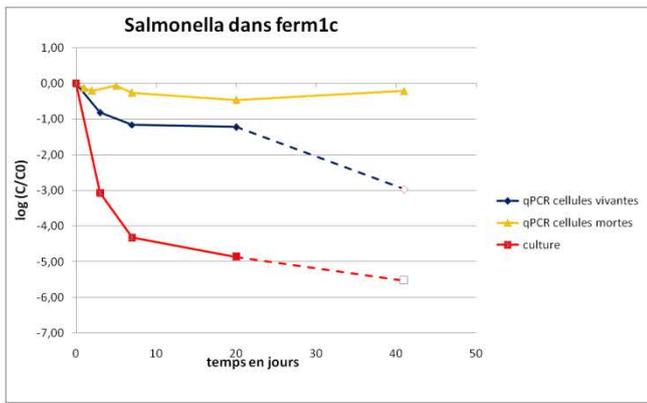
VII. Annexes

Tableau A : description des 13 PROs de l'étude (c = compost ; L = liquide ; b = brut ; S = solide ; R = retentat)

| PROs | déchets entrants | procédé de traitement | devenir |
|----------|---|---|--|
| Ferm14L | agricole : Fumier, céréales, pailles, pelouse | voie humide (53-55°C) temps de séjour 14-20 jours | séparation de phase stockage en lagune de la phase liquide (avec récupération du biogaz) et stockage en tas à l'air libre de la phase solide |
| Ferm14S | | | |
| Ferm11b | agricole : fumier bovins, graisse, herbes | voie sèche, 36-40°C à 50°C. temps de séjour de 1,5 mois | stockage en tas à l'air libre, mélangé à déchets verts puis compostage en andain |
| Terri 1b | territoriaux : lisier, boues d'industries agro-alimentaires, graisses | Digestion anaérobie, voie humide température mésophile (38°C) | séparation de phase par centrifugation. Phase solide homologuée, phase liquide ultrafiltrée, retentat stocké, filtrat va en osmose inverse puis utilisé pour irrigation des saules |
| Terri1S | | | |
| Terri1R | | | |
| Terri2S | territoriaux : déchets agro-alimentaires, céréales | voie humide (40°C) temps de séjour 60 jours. Post digestion température ambiante 30-35jours | séparation de phase. Phase solide compostée, phase liquide stockée |
| Terri2L | | | |
| Terri3S | territoriaux : déchets agro-alimentaires, biodéchets, boues de STEP, végétaux | voie liquide (37°C), temps de séjour 30-35 jours, puis post-digestion 17 jours | stockage avant épandage |
| Terri3L | | | |
| OMR1L | Ordures ménagères (OMR) | voie sèche (38°C), temps de séjours 21 jours | séparation de phase. Phase liquide stockée en bassin couvert et phase solide compostée |
| OMR1C | | | |
| Terri4S | territoriaux : déchets agro-alimentaires, boues de STEP, Fumier, graisses, céréales | voie liquide (37°C), temps de séjour 45-50 jours, post-digestion 30-35 jours | séparation de phase du digestat. Phase solide stockée en tas à l'air libre |

Tableau B : description des 9 PROs étudiés en microcosmes

| PROs | déchets entrants | temps de séjour | devenir avant épandage |
|--------|---|--|--|
| Ferm5c | agricole : lisier, maïs, déchets de légumes, tontes, déchets d'aliments et déchets de céréales | 30-32 jours | Séparation de phase puis compostage en andain sous abris de la phase solide et envoi en station biologique de la phase liquide |
| Ferm5L | | 36 jours | |
| Ferm1c | Agricole (lisier) et co-substrats (boues de STEP, boues agroalim, graisses agroalim, graisses de collecte, biodéchets). | 38 jours, puis post-digestion (18 jours) | compostage puis séchage |
| Ferm2L | Lisier porcin, déchets agro-alimentaire, co-substrat végétaux, digestat recirculé et oxide ferrique | 50-60 jours | stockage en lagune |
| Ferm9b | fumier et lisier, parfois quelques végétaux (maïs, ensilage...) | 9 jours puis post-digestion 6-7 jours | stockage en cuve de post-digestion |
| Ferm4b | co-substrat végétaux (légumes, céréales), lactose, fumier bovin, lisiers | 20-30 jours | stockage en cuve ouverte |
| Ferm7c | effluent et co-substrat (co-substrat végétaux) | 60 jours | Séparation de phase. Compostage en andain de la phase solide stockée sous abris. Phase liquide stockée en cuve à l'air libre |
| Ferm7L | | 80-90 jours | |
| Ferm3b | lisier porcin, co-substrats végétaux solides (herbe, maïs ensilage, déchets de céréales grandes cultures), graisses Agro-alimentaires liquides. | 80 jours comprenant post-digestion | stockage en cuve ouverte |



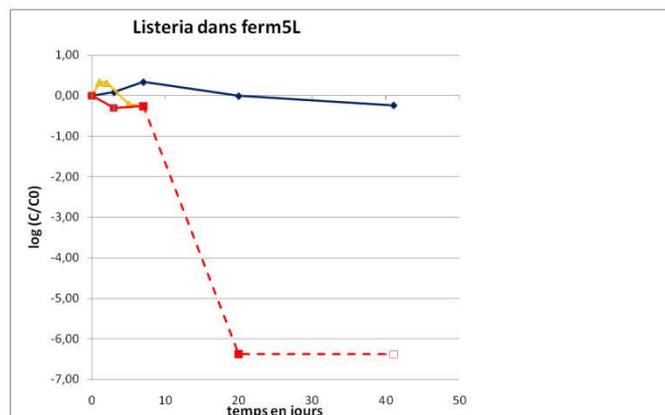
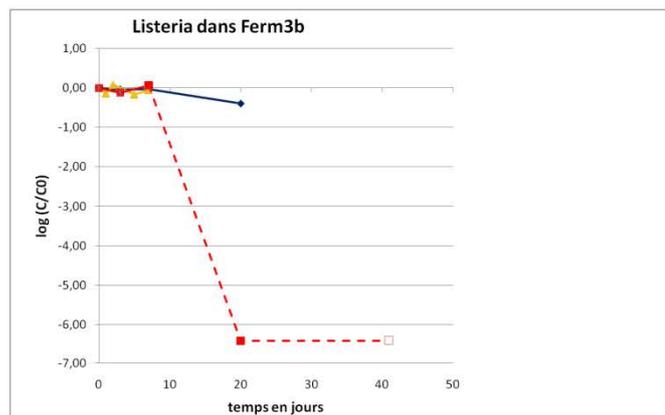
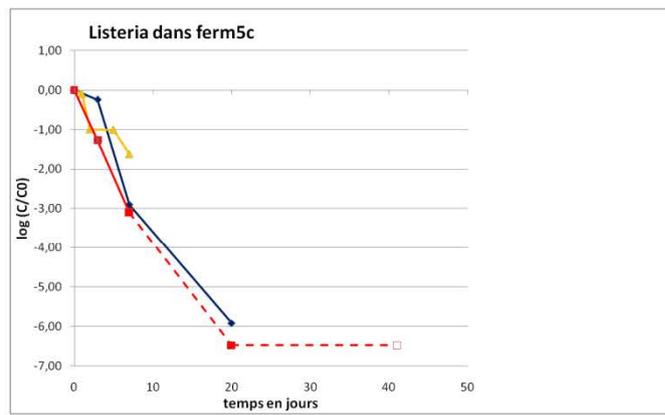
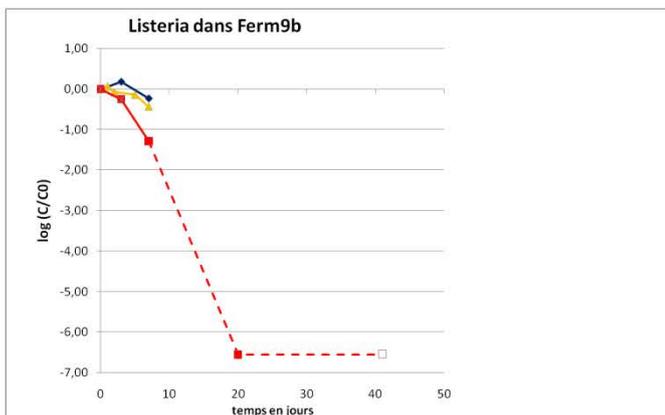
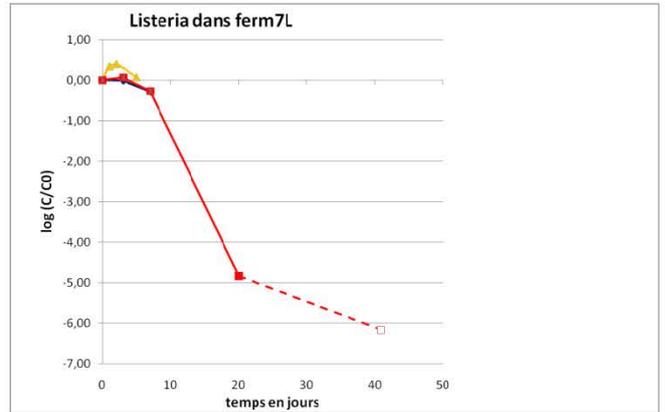
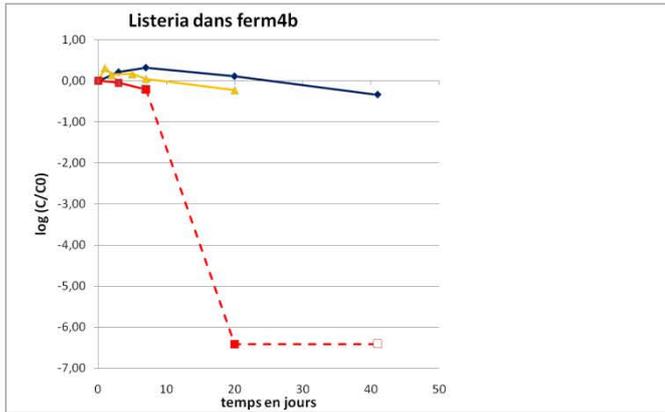
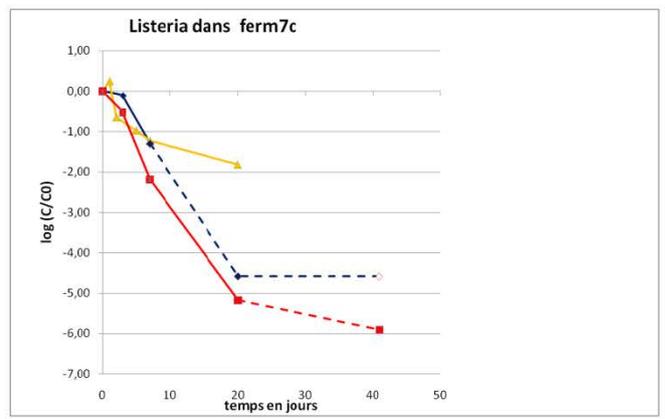
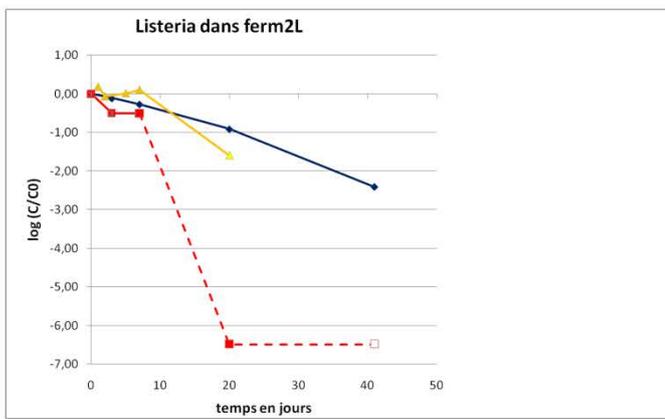


Figure A : vitesse d'abattement de *Listeria* et *Salmonella* en microcosmes dans les 9 PROs de l'étude.

Tableau C : matrice de corrélation des facteurs biotiques et abiotiques mesurés dans les 13 PROs de l'étude.

| | Activité résiduelle anaérobie | ATP | E.coli | Fraction facilement accessible | FDA | Humidité | Fraction non extraite | Fraction peu accessible | pH |
|--------------------------------|-------------------------------|-------|--------|--------------------------------|-------|----------|-----------------------|-------------------------|-------|
| Activité résiduelle anaérobie | 1,00 | 0,44 | 0,29 | 0,11 | -0,44 | 0,00 | -0,73 | 0,54 | -0,13 |
| ATP | 0,44 | 1,00 | 0,37 | 0,43 | -0,16 | 0,05 | -0,42 | -0,10 | 0,48 |
| E.coli | 0,29 | 0,37 | 1,00 | -0,08 | -0,04 | -0,36 | -0,22 | 0,26 | -0,13 |
| Fraction facilement accessible | 0,11 | 0,43 | -0,08 | 1,00 | -0,63 | 0,83 | -0,72 | -0,77 | -0,28 |
| FDA | -0,44 | -0,16 | -0,04 | -0,63 | 1,00 | -0,81 | 0,74 | 0,27 | 0,68 |
| Humidité | 0,00 | 0,05 | -0,36 | 0,83 | -0,81 | 1,00 | -0,55 | -0,72 | -0,51 |
| Fraction non extraite | -0,73 | -0,42 | -0,22 | -0,72 | 0,74 | -0,55 | 1,00 | 0,14 | 0,47 |
| Fraction peu accessible | 0,54 | -0,10 | 0,26 | -0,77 | 0,27 | -0,72 | 0,14 | 1,00 | 0,16 |
| pH | -0,13 | 0,48 | -0,13 | -0,28 | 0,68 | -0,51 | 0,47 | 0,16 | 1,00 |

Tableau D : matrice de corrélation entre l'abattement de *Salmonella* et *Listeria* à T3 jours et les différents paramètres biotiques et abiotiques mesurés dans les 9 PROs de l'étude.

| | Abt T3 Listeria | Abt T3 Salmo | Activité résiduelle anaérobie | ATP | FDA | Fraction facilement accessible | Fraction peu accessible | Humidité |
|--------------------------------|-----------------|--------------|-------------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------------------------|----------|
| AbtT3 Listeria | 1,00 | -0,03 | -0,47 | -0,45 | 0,25 | -0,51 | 0,57 | -0,89 |
| AbtT3 Salmo | -0,03 | 1,00 | 0,47 | -0,28 | -0,42 | 0,47 | -0,64 | 0,32 |
| Activité résiduelle anaérobie | -0,47 | 0,47 | 1,00 | 0,16 | -0,50 | 0,49 | -0,73 | 0,75 |
| ATP | -0,45 | -0,28 | 0,16 | 1,00 | 0,51 | -0,18 | 0,03 | 0,17 |
| FDA | 0,25 | -0,42 | -0,50 | 0,51 | 1,00 | -0,67 | 0,72 | -0,57 |
| Fraction facilement accessible | -0,51 | 0,47 | 0,49 | -0,18 | -0,67 | 1,00 | -0,68 | 0,70 |
| Fraction peu accessible | 0,57 | -0,64 | -0,73 | 0,03 | 0,72 | -0,68 | 1,00 | -0,81 |
| Humidité | -0,89 | 0,32 | 0,75 | 0,17 | -0,57 | 0,70 | -0,81 | 1,00 |

Tableau E : matrice de corrélation entre l'abattement de *Salmonella* et *Listeria* à T7 jours et les différents paramètres biotiques et abiotiques mesurés dans les 9 PROs de l'étude en microcosmes.

| | Abt T7 Listeria | Abt T7 Salmo | Activité résiduelle anaérobie | ATP | FDA | Fraction facilement accessible | Fraction peu accessible | Humidité |
|--------------------------------|-----------------|--------------|-------------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------------------------|----------|
| AbtT7 Listeria | 1,00 | 0,05 | -0,37 | -0,21 | 0,39 | -0,33 | 0,76 | -0,38 |
| AbtT7 Salmo | 0,05 | 1,00 | 0,46 | 0,69 | 0,21 | 0,05 | 0,01 | 0,38 |
| Activité résiduelle anaérobie | -0,37 | 0,46 | 1,00 | 0,16 | -0,50 | 0,49 | -0,73 | 0,75 |
| ATP | -0,21 | 0,69 | 0,16 | 1,00 | 0,51 | -0,18 | 0,03 | 0,17 |
| FDA | 0,39 | 0,21 | -0,50 | 0,51 | 1,00 | -0,67 | 0,72 | -0,57 |
| Fraction facilement accessible | -0,33 | 0,05 | 0,49 | -0,18 | -0,67 | 1,00 | -0,68 | 0,70 |
| Fraction peu accessible | 0,76 | 0,01 | -0,73 | 0,03 | 0,72 | -0,68 | 1,00 | -0,81 |
| Humidité | -0,38 | 0,38 | 0,75 | 0,17 | -0,57 | 0,70 | -0,81 | 1,00 |

NB : les cases en jaunes représentent les coefficients significatifs.

Tableau F : résultats des mesures de paramètres physico-chimiques, activités microbiennes et contamination en *E. Coli* des 9 PROs de l'étude en microcosmes. (BMP : potentiel méthane ; fraction facilement/ peu/ non extractible : accessibilité chimique de la matière organique ; FDA : hydrolyse de la fluorescéine di-acétate ; ATP : contenu en ATP)

| PRO | <i>E. coli</i> | fraction facilement accessible | fraction peu accessible | fraction non extractible | BMP | Activité résiduelle anaérobie | FDA | ATP | % humidité |
|--------|----------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|-------------------------------|-------|-------|------------|
| Ferm1c | 0 | 4,01 | 53,36 | 42,63 | 59,24 | 19,126 | 182,1 | 6,286 | 25,4 |
| Ferm5c | 3,689 | 6,94 | 77,8 | 15,26 | 25,01 | 17,476 | 269,9 | 6,981 | 56,1 |
| Ferm2L | 0 | 45,35 | 16,92 | 37,73 | 93,12 | 53,405 | 82,5 | 6,097 | 93,6 |
| Ferm3b | 0 | 44,28 | 12,31 | 43,41 | 100,7 | 35,900 | 73,5 | 6,312 | 95,77 |
| Ferm9b | 1,654 | 9,51 | 30,54 | 59,95 | 98,7 | 53,668 | 168,4 | 7,086 | 89,81 |
| Ferm7L | 2,301 | 62,87 | 22,2 | 14,93 | 55,89 | 40,855 | 117,1 | 6,987 | 88,6 |
| Ferm7c | 0,204 | 5,36 | 39,71 | 54,93 | 28,7 | 0,018 | 232,6 | 7,057 | 59,1 |
| Ferm4b | 0,204 | 32,69 | 13,9 | 53,41 | 182,2 | 66,622 | 236,1 | 7,283 | 91,31 |
| Ferm5L | 3,804 | 31,15 | 5,37 | 63,49 | 36,4 | 72,950 | 68,49 | 7,022 | 97,35 |

Résumé :

Dans un contexte actuel d'économie d'énergie et de valorisation des déchets, le procédé de méthanisation apparaît comme une alternative très intéressante pour le traitement des déchets. Il permet de produire du biogaz (méthane et dioxyde de carbone) ainsi qu'un digestat. Ce dernier, riche en éléments fertilisants, peut être utilisé comme amendement organique lors de l'épandage au champs. L'hygiénisation du digestat est très importante afin d'éviter un risque environnemental ou sanitaire lié à une contamination par des microorganismes pathogènes. Le procédé de méthanisation permet de réduire les concentrations en pathogènes mais un redéveloppement ou une recontamination peuvent être observés au cours du stockage. Le but de cette étude sera de regarder l'influence de différents facteurs biotiques (activité microbienne) et abiotiques (devenir de la matière organique) sur la dynamique de survie de 2 bactéries pathogènes (*Listeria* et *Salmonella*). Les résultats obtenus apporteront des informations clés permettant de mieux contrôler la survie des pathogènes et ainsi assurer des conditions de stockage optimales.

Summary:

In a current context of saving energy and waste management, anaerobic digestion is one way for treating organic wastes. This process produces biogas (methane and carbon dioxide) and digestate. Digestate, which contained fertilizer components appeared to be an effective fertilizer for agriculture. The sanitation of digestate is very important to limit environmental and health risks related to pathogenic microorganisms. Anaerobic digestion process allowed to reduce pathogenic microorganism infection but which could re-appear during storage. This study aims at investigating biotic (microbial activity) or abiotic (organic matter content) factors that influence the survival of two pathogenic bacteria (*Listeria* and *Salmonella*). Those results will provide key informations allowing a better control on survival of pathogens and to lead to favorable storage conditions for the reduction of health risks.

