



Qualité sanitaire des rejets des élevages porcins : Evaluation des filières de traitement biologique du lisier en bactériologie et microbiologie moléculaire

P. Dabert, A.M. Pourcher, T. Bouchez, C. Bureau

► To cite this version:

P. Dabert, A.M. Pourcher, T. Bouchez, C. Bureau. Qualité sanitaire des rejets des élevages porcins : Evaluation des filières de traitement biologique du lisier en bactériologie et microbiologie moléculaire. irstea. 2009, pp.102. hal-02604524

HAL Id: hal-02604524

<https://hal.inrae.fr/hal-02604524>

Submitted on 16 May 2020

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

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



16 mars 2009

Qualité sanitaire des rejets des élevages porcins : Évaluation des filières de traitement biologique du lisier en bactériologie et microbiologie moléculaire

*Sanitary quality of pig rearing effluents: evaluation of liquid
manure biological treatment processes with bacteriology and
molecular microbiology approaches*

**Patrick DABERT¹, Anne-Marie POURCHER¹,
Théodore BOUCHEZ², Chrystelle BUREAU²**

***Travaux soutenus dans le cadre de l'APR santé
Environnement de l'AFSSET***

Rapport final mars 2009

N°de contrat ADEME: **05 75 C 0031**

Date du contrat: 18/11/2005

Durée du contrat: 3 ans

Resp. ADEME: I. DEPORTES

Confidentialité:

non (X)

oui ()

Cemagref, gpts de Rennes¹ et Antony²

Unité GERE

17, avenue de Cucillé

CS 64427 35044 Rennes cedex

Responsable projet : Patrick Dabert

Tel : 02 23 48 21 21

RESUME du PROJET

Chaque année 50 millions de tonnes de lisier de porcs sont épandues sur le sol français, dont plus de la moitié sur la seule région Bretagne. L'augmentation des capacités d'accueil et la concentration des exploitations ont entraîné des problèmes de pollution azotée qui semblent maîtrisables par l'installation de procédés de traitement sur les grandes exploitations. Ces procédés n'ayant pour la plupart pas été testés pour leur capacité d'hygiénisation des lisiers, le risque microbiologique que représente l'épandage de leurs effluents reste en suspend. D'autre part, l'application des outils de microbiologie moléculaire (ADNr 16S) à la caractérisation de la flore fécale et du lisier porcin a mis en évidence la faible représentativité des espèces cultivées par rapport au nombre d'espèces totales de ces écosystèmes.

Dans ce projet nous avons analysé l'impact des procédés actuels de traitement du lisier de porcs sur la qualité sanitaire des rejets d'élevage par deux approches :

1. Une approche de bactériologie classique par dénombrement des germes d'intérêt sanitaire (*Escherichia coli*, entérocoques, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes*) à travers les filières de traitement.

2. Une approche de typage moléculaire (PCR de l'ADNr 16S et CE-SSCP) qui permet de suivre l'évolution de la communauté microbienne à travers les filières de traitement et d'identifier les micro-organismes qui persistent, qu'ils soient cultivables ou non.

Dans un premier temps, 17 élevages ont été suivis par des mesures en entrée et sortie de filière de traitement. Dans un second temps, une analyse des filières a été réalisée étape par étape sur 4 types de filières : un simple stockage en fosse et 3 procédés de traitement biologique. Les paramètres physico-chimiques des échantillons ont été caractérisés afin de permettre une analyse combinée de leur évolution et de celle des populations microbiennes observées par les approches culturales et moléculaires à chaque étape de la filière.

Les approches de microbiologie culturale et moléculaires ont donné des informations complémentaires. L'approche culturale a montré (1) une forte variabilité des concentrations en germes indicateurs dans les lisiers bruts et stockés de 2×10^2 à $1,4 \times 10^5$ *E. coli*, $1,8 \times 10^3$ à $4,5 \times 10^5$ entérocoques et de $4,8 \times 10^1$ à $7,2 \times 10^4$ spores de *C. perfringens* par gramme de matière brute, indépendamment de la durée de stockage (1 à 6 mois), démontrant un impact limité du stockage en fosse, (2) un effet inhibiteur des quatre filières de traitement sur l'ensemble des germes cultivés (de 1 à 4 unités logarithmiques), sans toutefois obtenir une hygiénisation complète des produits, l'impact le plus fort étant observé lors du stockage des phases solides séparées ("pseudo compostage") et lors du lagunage (3) une différence de survie des trois germes indicateurs au cours des traitements, les spores de *Clostridium* étant plus résistantes (4) la présence dans les lisiers et leurs sous-produits destinés à l'épandage de germes pathogènes présentant des sérotypes impliqués dans les toxi-infections alimentaires (*Salmonella* Typhimurium, Infantis, Hadar et *L. monocytogenes* 1/2a, 4b et 4e).

L'approche moléculaire a montré une évolution globale de la communauté microbienne du lisier avec les

mêmes tendances (1) une faible évolution des profils des communautés microbiennes des lisiers pendant le simple stockage en fosse et la présence systématique de populations dominantes, appartenant principalement aux groupes des *Bacteroidales* et des *Clostridium*, et apparemment communes aux lisiers bruts et aux lisiers stockés, (2) un impact fort des traitements biologiques sur les communautés microbiennes des lisiers mais qui laisse persister quelques populations dominantes au travers des filières, (3) une incapacité à quantifier par technique FISH la survie de deux populations dominantes des lisiers au travers des filières de traitement.

Si les traitements biologiques et physiques appliqués au lisier entraînent bien un abattement des *E. coli* et des entérocoques, ils ne sont cependant pas suffisants pour éliminer totalement les germes d'origine animale, notamment les salmonelles et *L. monocytogenes*, ce qui implique l'existence d'un danger potentiel de dissémination des germes pathogènes dans l'environnement.

Mots clés : lisier de porcs, traitement biologique, micro-organismes indicateurs, micro-organismes pathogènes, PCR, SSCP, FISH.

SUMMARY OF THE PROJECT

Each year 50 million tons of pig manure is spread on French soil, with more than half of it on the only region of Brittany. The increase in capacity and the concentration of farms have led to nitrogen pollution problems that seem beyond the control of the installation of treatment processes on large farms. These processes have, for the most part, not been tested for their ability to hygienise manure. The microbiological risk that represents the spreading of their manure is still pending. On the other hand, the application of molecular tools (16S rRNA based) for the characterization of pig faecal and pig slurry microbial communities highlighted the unrepresentative nature of cultured microorganisms compared to the total number of species of these ecosystems.

In this project we analyzed the impact of the current pig manure treatment processes on the microbiological quality of livestock waste by two approaches:

1. An approach of classical bacteriology by numeration of indicator microorganisms (*Escherichia coli*, enterococci, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*) through treatment processes.
2. An approach of molecular typing (PCR of 16S rDNA and CE-SSCP) that tracks the evolution of microbial communities through treatment processes and identifies microorganisms that persist without isolation and culture.

In a first stage, 17 farms were followed by measures at the input and output of the processes. In a second step, an analysis of livestock management was carried out step by step for 4 different processes: a single storage tank and 3 biological treatment processes. The physico-chemical sample characteristics were analyzed to enable a combined analysis of their evolution along with the microbial populations evolution observed by cultivation and molecular approaches.

Both cultural and molecular microbiology approaches gave additional information. The cultural approach showed (1) a high variability of indicator bacteria concentrations in raw and stored manure from 2×10^2 to $1,4 \times 10^5$ *E. coli*, $1,8 \times 10^3$ to $4,5 \times 10^5$ enterococci and from $4,8 \times 10^1$ to $7,2 \times 10^4$ *C. perfringens* spores per gram of raw matter, regardless of storage duration (from 1 to 6 months), demonstrating a limited impact of storage, (2) an inhibitory effect of the four treatment processes on all cultured microorganisms (of 1 to 4 logarithmic units), but that could not reach a complete sanitisation of the products, the major impact being during storage of solid and liquid as "compost" and pond respectively (3) a difference in survival of the three indicator bacteria during treatment, (4) the presence in manure and by-products intended for spreading of pathogens with serotypes implicated in foodborne illness (*Salmonella* Typhimurium, Infantis, Hadar and *L. monocytogenes* 1/2a, 4b and 4e).

The molecular approach showed the same trends through the evolution of the slurry microbial communities (1) a slow evolution of the slurry microbial community profiles during simple storage and the systematic presence of dominant populations, mainly belonging to the groups of *Bacteroidales* and *Clostridium*, and apparently common to raw and stored slurry, (2) a strong impact of biological treatments on the slurry microbial communities but leaving some populations persisting through the processes, (3) an inability of the

FISH technique to quantify the survival of two dominant populations through the slurry treatment processes.

If the biological and physical treatments applied to manure cause a reduction of *E. coli* and enterococci, they are not sufficient to eliminate the bacteria of animal origin, including *Salmonella* and *L. monocytogenes*, which implies a potential danger of spreading pathogens in the environment.

Key words: pig slurry, biological treatment, indicator microorganisms, pathogenic microorganisms, PCR, SSCP, FISH.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	03
SUMMARY.....	05
TABLE DES FIGURES.....	11
TABLE DES TABLEAUX.....	13
LEXIQUE.....	15
AVANT PROPOS.....	17
1. INTRODUCTION	19
1.1. Les filières de traitement des lisiers	19
1.2. Les risques sanitaires liés à l'épandage du lisier	20
1.3. Approches utilisées pour la détection des micro-organismes	21
1.4. Objectifs de ce projet	25
2. MATERIELS ET METHODES	27
2.1. Mise en place de la campagne de prélèvement	27
2.2. Réalisation des prélèvements	28
2.3. Analyses physico-chimiques	28
2.4. Recherche des indicateurs de traitement et des bactéries pathogènes	29
2.4.1. Dénombrement de <i>E. coli</i> et des entérocoques.....	29
2.4.2. Dénombrement de <i>Clostridium perfringens</i>	30
2.4.3. Dénombrement de <i>Salmonella sp.</i>	31
2.4.4. Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.5. Analyse des communautés microbiennes par FISH	32
2.5.1. Fixation des échantillons.....	32
2.5.2. Hybridation des échantillons.....	32
2.6. Suivi des communautés microbiennes par typage moléculaire	33
2.6.1. Méthodologie.....	33
2.6.2 Matériels biologiques et extractions d'ADN.....	34
2.6.3. PCR (Réactions de polymérisation en chaîne).....	34
2.6.4. Electrophorèse capillaire single strand conformation polymorphism (CE-SSCP).....	36
2.6.5. Identification des pics observés en CE-SSCP	36
3. RESULTATS	39
3.1. Caractérisation physico-chimique des prélèvements	39
3.1.1. Résultats par type de prélèvement	39
3.1.2. Résultats par filière.....	39
3.2. Analyses bactériologiques	43
3.2.1. Analyse des entrées et sorties des filières.....	43
3.2.2. Conclusions.....	45
3.2.3. Suivi des germes le long des filières.....	46
3.2.4. Conclusions.....	49
3.3. Résultats des analyses moléculaires.....	51
3.3.1. Suivi des communautés microbiennes par CE-SSCP ciblant l'ADNr 16S.....	51
3.3.1a. Méthode d'analyse des profils SSCP et développement du logiciel Safus.....	51
3.3.1b. Comparaison des profils SSCP obtenus dans un même type d'ouvrage.....	55

3.3.1c. Conclusions.....	56
3.3.1d. Comparaison des profils SSCP obtenus par filière de traitement.....	59
3.3.1e. Conclusions sur l'analyse des communautés microbiennes par PCR-SSCP et ACP...	66
3.3.2. Identification des pics dominant les profils SSCP des lisiers frais et stockés.....	67
3.3.3. Suivi des populations dominantes dans une filière par technique FISH.....	70
3.3.3a. Essais de faisabilité de la techniques FISH sur des échantillons de lisiers.....	70
3.3.3b. Design de sondes spécifiques des séquences des pics 2 et 4 identifiés par SSCP et clonage.....	74
3.3.3c. FISH à l'aide des sondes EUB338 (Cy3) + Bac303 (FITC) + CFB1082 (Cy5).....	75
3.3.3d. FISH à l'aide des sondes EUB338 (FITC) + Bac650 (Cy3) ou Bac151 (Cy3).....	76
3.3.3e. Conclusion des essais de FISH.....	77
4. DISCUSSION	81
4.1. Paramètres physico-chimiques des lisiers et effluents	81
4.2. Dénombrement des germes indicateurs et pathogènes des lisiers et des effluents	81
4.2.1. Impact des traitements sur les germes indicateurs de traitement.....	82
4.2.2. Concentrations en Salmonella et prévalence de L. monocytogenes dans les effluents d'élevages porcins.....	85
4.3. Analyses moléculaires des communautés microbiennes des effluents	86
5. CONCLUSION	89
BILIOGRAPHIE.....	91
PUBLICATIONS ET RAPPORTS LIES AUX TRAVAUX EFFECTUES.....	95
ANNEXES 1.....	97
ANNEXES 2.....	98
ANNEXES 3.....	99
ANNEXES 4.....	100
ANNEXES 5.....	101
ANNEXES 6.....	102

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des 5 filières de gestion des lisiers utilisées en Bretagne	18
Figure 2 : Principe de l'hybridation <i>in situ</i> des ARNr sur cellules entières	22
Figure 3 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la stratégie utilisée pour suivre l'évolution d'une communauté microbienne par la méthode de PCR des ADNr 16S et CE-SSCP	24
Figure 4 : Schéma des 5 filières étudiées et localisation des points de prélèvement	26
Figure 5 : Système d'homogénéisation mobile utilisé dans les fosses à lisier	28
Figure 6 : Concentrations moyennes (exprimées par g de matière brute) en <i>E. coli</i> et en entérocoques et présence de salmonelles et de <i>L. monocytogenes</i> dans les lisiers et les sous-produits issus du traitement de 17 élevages porcins	43
Figure 7 : Concentrations moyennes en spores de <i>C. perfringens</i> dans les lisiers et les sous-produits issus du traitement de 17 élevages porcins	43
Figure 8 : Concentrations en entérocoques et en spores de <i>C. perfringens</i> en fonction des concentrations en <i>E. coli</i> dans les lisiers et leurs sous-produits	44
Figure 9 : Concentrations moyennes en <i>E. coli</i> et en entérocoques observées en 2007 et 2008 dans le lisier brut et dans les sous-produits issus du traitement de 4 types d'élevages	46
Figure 10 : Concentrations moyennes en spores de <i>C. perfringens</i> observées en 2007 et 2008 dans le lisier brut et les sous-produits issus du traitement de 4 types d'élevages	47
Figure 11 : Profils SSCP de l'échantillon de lisier brut de l'élevage H, pour les différents groupes microbiens recherchés	50
Figure 12 : Comparaison des profils SSCP par ACP	52
Figure 13 : Alignement des profils SSCP des Bactéries totales obtenus pour tous les échantillons et résultats des ACP correspondantes	54
Figure 14 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 0 et résultats de l'analyse ACP	58
Figure 15 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 2	60
Figure 16 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 3	62
Figure 17 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 4	64
Figure 18 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales des lisiers bruts et lisiers stockés analysés en 2006 et 2007	67
Figure 19 : Positionnement phylogénétique des séquences des 4 pics dominants observés dans les lisiers bruts et stockés des prélèvements de l'année 2006	69
Figure 20 : Observation au MCBL de l'échantillon contrôle positif hybridé par la technique FISH avec les sondes Bactéries et la sonde Archée	72
Figure 21 : Observation en FISH des échantillons de lisier brut avec les sondes Bactérie et Archée	73
Figure 22 : Observation en FISH des échantillons de boues aérées des réacteurs de traitement et des lagunes avec les sondes Bactérie et Archée	74
Figure 23 : Hybridation <i>in situ</i> de 4 échantillons de boues activées à l'aide des sondes EUB338, Bac303, CFB1082	77
Figure 24 : Hybridation <i>in situ</i> d'un échantillon de lisier brut de l'élevage B à l'aide des sondes EUB338 et BAC650	78

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Germes recherchés et méthodes utilisées	29
Tableau 2 : Technique de dénombrement d' <i>E. coli</i>	30
Tableau 3 : Technique de dénombrement des entérocoques	30
Tableau 4 : Technique de dénombrement de <i>C. perfringens</i>	30
Tableau 5 : Protocole de dénombrement de <i>Salmonella sp.</i>	31
Tableau 6 : Protocole de recherche de <i>L. monocytogenes</i>	31
Tableau 7 : Spécificité des sondes utilisées dans l'étude	33
Tableau 8 : Caractérisation des amorces utilisées pour amplifier l'ADNr 16S	35
Tableau 9 : Préparation pour les réactions de PCR	35
Tableau 10 : Paramètres des PCR effectuées sur le thermocycler MJ mini (Bio-Rad)	35
Tableau 11 : Comparaison des paramètres physico-chimiques des effluents analysés en 2006, 2007 et 2008	38
Tableau 12 : Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées du lisier brut et du lisier stocké en % de lisier brut	39
Tableau 13 : Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées des différents prélèvements par rapport au lisier brut initial (en % de lisier brut)	40
Tableau 14 : Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées des différents prélèvements par rapport au lisier brut initial (en % de lisier brut)	41
Tableau 15 : Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées des différents prélèvements par rapport au lisier brut initial (en % de lisier brut)	41
Tableau 16 : Effet des traitements sur les 3 germes indicateurs	44
Tableau 17 : Concentrations en <i>Salmonella</i> (g ⁻¹ MB) et prévalence de <i>L. monocytogenes</i> dans les lisiers bruts et les sous-produits de 17 élevages	45
Tableau 18 : Comparaison des abattements des trois germes indicateurs pour les deux années d'étude	48
Tableau 19 : Valeurs maximales en salmonelles dans les lisiers et les sous-produits des élevages de types 2, 3 et 4	49
Tableau 20 : Identification des pics 1 à 4 par comparaison avec les bases de données	68
Tableau 21 : Echantillons évalués en FISH	71
Tableau 22 : Caractéristiques des sondes utilisées	75

LEXIQUE

ACP Analyse en Composante Principale

ADNr 16S Acide Désoxyribonucléique ribosomal 16S = gène codant pour les ARNr 16S

AGV Acides Gras Volatiles (acides gras à chaînes courtes)

ARNr 16S Acide Ribonucléique ribosomal 16S

BA Boues du réacteur aéré

BE Boue stockée épandue (**BEL** = phase liquide, **BES** = phase solide)

BET Bromure d'Ethidium

CE-SSCP Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism

DAPI Diamidino-4,6-phénylindol-2 dichlorhydrate

DCO Demande Chimique en Oxygène

Eau ppi Eau purifiée pour injection (utilisée pour les réactions de PCR)

F forward, amorce dans le sens du gène

FAM 6-Carboxifluorescéine

FISH Fluorescent *in situ* hybridization

LAG Lagune

LB Lisier Brut

LS Lisier stocké

MB Matière Brute

MCBL Microscope confocal à balayage laser

MES Matières en Suspension

MS Matière Sèche

MVS Matières Volatiles en Suspension

NH₃ Ammoniac/ammoniaque

NPP Nombre le Plus Probable

NTK Azote Total Kjeldahl

pb Paire de bases nucléotidiques

PCR Polymerization Chain Reaction

qPCR quantitative Polymerase Chain Reaction

R Reverse, amorce en antisens du gène

RBS, RBL Refus de séparation des boues en sortie de presse (S, phase solide et L, phase liquide)

RDP Ribosomal Database Project

rpm Révolutions par minute

RS ou RCS Refus de séparation (phase solide du lisier en sortie de décanteur centrifuge)

V3 Région Variable 3 de l'ADNr 16S

AVANT PROPOS

Sans en être réellement la suite, ce travail s'appuie d'une part sur la typologie des élevages porcins réalisée par le Cemagref de Rennes dans le cadre du projet "Bilan environnemental des procédés de traitement biologique des lisiers de porcs" financé par l'ADEME (contrat n° 02 75 041), et d'autre part sur l'action AC43d "Dynamique des écosystèmes microbiens et survie des pathogènes dans les effluents d'élevage" réalisée à l'INRA de Narbonne et financée dans le cadre du GIS Porcherie Verte. Une partie des travaux présentés ici a participé aux résultats de la thèse de 3^{ème} cycle de Romain Marti intitulée : "Recherche de marqueurs spécifiques des effluents d'élevage. Etude de leur comportement au cours des procédés de traitement et lors de l'épandage" (Convention Ademe/Cemagref). Les personnes intéressées par le développement des méthodes de qPCR pour le suivi des micro-organismes dans les effluents d'élevage sont invitées à s'y référer. De même, les travaux de bactériologie initiés dans ce programme de recherche sont actuellement poursuivis sur une trentaine d'élevages dans le cadre d'un projet intitulé ESALIS et financé par l'AFSSET.

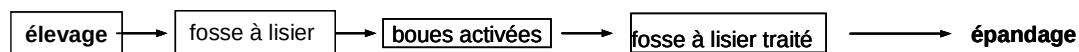
Pour le choix des élevages et l'organisation des prélèvements, les auteurs remercient Messieurs Bertrand Le Bris de la Chambre d'Agriculture d'Ille et Vilaine, Christophe Le Louarn de la société Valétec et Claude Geffrelot de la société Dénitral. Les auteurs remercient aussi les éleveurs qui ont participé activement aux prélèvements, les personnels de l'équipe EPURE du Cemagref de Rennes (Christine Ziebal, Magalie Kervarrec, Sylvie Picard et Patricia Saint Cast) et de l'Unité HBAN du Cemagref d'Antony, ainsi que les étudiants qui ont travaillé au laboratoire sur le projet (Aurore Thorigné et Benoît Jégou en 2006 ; Aline Viel, Julien Royer, Fabien Cousin et Erika Besson en 2007 ; Fabrice Boutin, Jennifer Rivière et Mélanie Bocquel en 2008).

Patrick Dabert et Anne-Marie Pourcher sont membres de l'Unité GERE du Cemagref de Rennes, Théodore Bouchez et Chrystelle Bureau sont membres de l'Unité HBAN du Cemagref d'Antony.

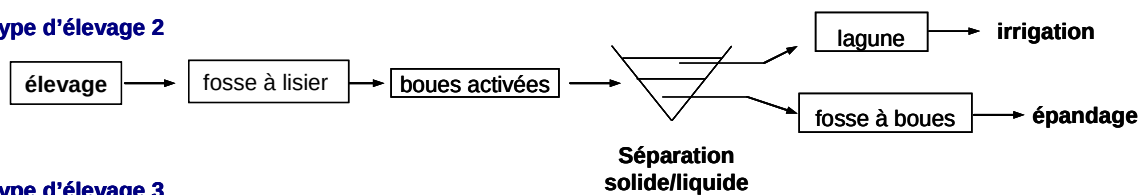
Type d'élevage 0



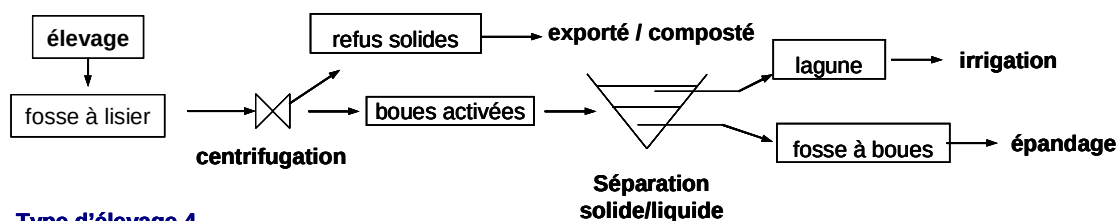
Type d'élevage 1



Type d'élevage 2



Type d'élevage 3



Type d'élevage 4

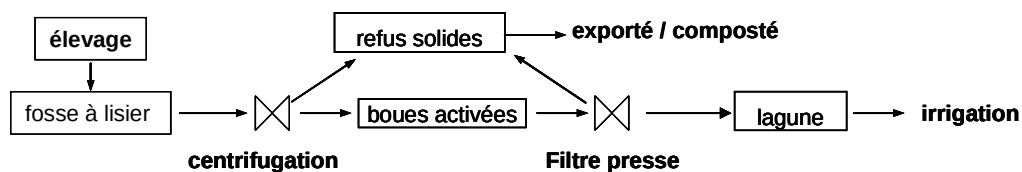


Figure 1 : schéma des 5 filières de gestion des lisiers utilisées en Bretagne. Type 0, stockage simple du lisier sans traitement. Types 1 à 4, les différents types de traitement physique et biologique de lisier.

1. INTRODUCTION

1.1. Les filières de traitement des lisiers

Le lisier est l'effluent principal des porcheries hors sol françaises. Il est produit par le mélange des déjections animales (fèces et urines) et des eaux de lavage des bâtiments. Riche en matière organique et en azote, il est principalement utilisé comme amendement pour les cultures. Le lisier produit pendant les périodes hivernales et estivales est donc stocké dans des fosses en béton en attente d'épandage au printemps et à l'automne (Type 0, figure 1). L'augmentation des capacités d'accueil et la concentration géographique des élevages en Bretagne ont conduit à un dépassement des capacités d'assimilation des cultures et des sols qui ont résulté dans des problèmes importants de pollution des eaux continentales et côtières (Martinez et Le Bozec, 2000).

L'application de la directive européenne nitrate (91/676/CEE) a induit la mise en place de plans d'épandage stricts et la création de zones d'excédent structurel où les éleveurs sont contraints de traiter leurs effluents vis à vis de l'azote. Ainsi, lorsque la production de lisier est trop importante par rapport aux surfaces d'épandage, le lisier est traité par des procédés biologiques d'épuration installés dans les élevages. Les données concernant la Bretagne indiquent qu'en 2003, cette région comptait 209 stations de traitement du lisier, soit un volume de lisier traité estimé à 1,2 millions de m³ par an (Levasseur et Lemaire, 2003). Sur l'ensemble des filières, 78% sont composées d'un réacteur biologique auquel viennent s'ajouter des modules de stockage et de traitement physico-chimique (séparation de phase) du lisier (Loyon *et al.*, 2003). Le compostage et les autres traitements (physiques et/ou chimiques) ne représentent que 17% et 5% des filières, respectivement. Les principales filières de traitement peuvent être classées en quatre types (Figure 1) :

Type 1 : Ces installations sont composées d'un bassin de stockage et d'homogénéisation du lisier brut, suivi d'un réacteur d'aération permettant d'éliminer l'azote par nitrification-dénitrification et d'un bassin de stockage du lisier traité.

Type 2 : Ces installations, similaires à celles de type 1, comprennent en plus un ouvrage de décantation du lisier aéré qui permet un stockage séparé des boues et de la phase liquide issues du traitement.

Type 3 : Ces installations sont équipées comme celles de type 2, mais possèdent un système de séparation physique du lisier brut qui permet d'éliminer une partie des matières en suspension (notamment le phosphore particulaire) en amont du réacteur.

Type 4 : Ces installations présentent des caractéristiques identiques à celles de type 3 mais le système de décantation situé après le réacteur de traitement a été remplacé par un système de presse qui permet d'extraire les boues biologiques et de les retourner en tête du séparateur de phase mécanique placé en amont du réacteur de traitement.

Les filières de type 3 et 4 permettent d'abattre environ 75% de l'azote et d'exporter 20 à 80% du phosphore des lisiers dans les refus de séparation (phase solide provenant de la séparation physique du lisier brut).

1.2. Les risques sanitaires liés à l'épandage du lisier

Comme tous les excréments animaux, le lisier peut contenir des micro-organismes potentiellement pathogènes pour l'homme et/ou les animaux (Guan et Holley, 2003)]. Les micro-organismes les plus fréquemment retrouvés sont *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* (Hutchison *et al.*, 2004a; Bornay-Llinares *et al.*, 2006). Ainsi, l'épandage serait une voie d'entrée possible de différents pathogènes dans la chaîne alimentaire humaine. En effet, il a été observé une persistance de micro-organismes pathogènes dans les sols après l'épandage d'effluents d'élevages (Gessel *et al.*, 2004 ; Hutchison *et al.*, 2004a; Nicholson *et al.*, 2005). Le risque sanitaire est particulièrement important lorsque le lisier est épandu sur des sols destinés à recevoir des cultures de végétaux consommés crus (Guan et Holley, 2003 ; Nicholson *et al.*, 2005).

Il est possible d'estimer le danger sanitaire par la recherche de germes pathogènes ou le dénombrement de bactéries entériques et par l'évaluation de leur persistance au travers des filières de traitement. L'état sanitaire des lisiers est généralement évalué par le dénombrement des coliformes fécaux et de *E. coli* (Hill et Sobsey, 1998 ; Placha *et al.*, 2001 ; Hill et Sobsey, 2003 ; Chinivasam *et al.*, 2004 ; Vanotti *et al.*, 2005 ; Coté *et al.*, 2006a, 2006b ; Rufete *et al.*, 2006). D'autres germes indicateurs tels que les entérocoques, les spores de *C. perfringens* et les bactériophages ont aussi été dénombrés dans les lisiers (Hill et Sobsey, 1998 ; Placha *et al.*, 2001; Hill et Sobsey, 2003 ; Gessel *et al.*, 2004 ; Juteau *et al.*, 2004 ; Vanotti *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont montré une diminution des concentrations en indicateurs (*E. coli* et/ ou entérocoques) et de *Salmonella* au cours du stockage du lisier (Hill et Sobsey, 1998, Placha *et al.*, 2001 ; Hill et Sobsey, 2003 ; Chinivasagam *et al.*, 2004 ; Coté *et al.*, 2006b ; Arrus *et al.*, 2006).

Les études menées sur l'effet des procédés de traitement mettent en évidence l'implication de plusieurs facteurs sur la survie des micro-organismes entériques. Ainsi les conditions du traitement biologique aérobie ou anaérobie, le degré d'aération, la température, ou encore le traitement physique tel que la séparation solide/liquide semblent influencer la persistance des micro-organismes entériques présents dans les effluents d'élevage (Placha *et al.*, 2001 ; Hutchison *et al.*, 2005a). Toutefois, la plupart des études concernant la survie des germes entériques au cours du traitement du lisier ont été effectuées avec des ensemencements artificiels et sur des pilotes de laboratoire (Turner, 2002 ; Juteau *et al.*, 2004 ; Hutchison *et al.*, 2005a ; Vanotti *et al.*, 2005 ; Coté *et al.*, 2006b, Grewal *et al.*, 2007) ou lors d'un entreposage inerte du lisier sans apport de lisier frais (Placha *et al.*, 2001, Hutchison *et al.*, 2005b).

Il était donc important d'apporter des données de terrain qui soient spécifiques des élevages français, ce qui a été réalisé par l'estimation de l'état sanitaire des effluents de 17 élevages porcins bretons et par l'étude de l'effet hygiénisant des traitements couramment appliqués aux lisiers.

1.3. Approches utilisées pour la détection des micro-organismes

L'approche la plus utilisée actuellement pour étudier l'impact des procédés de traitement sur une matrice contaminée est le dénombrement des bactéries indicatrices (*E. coli*, entérocoques et *C. perfringens*) et des bactéries pathogènes par des méthodes culturales. Elle est fondée sur l'isolement ou l'enrichissement des micro-organismes à l'aide de milieux de culture sélectifs et sur leur identification par leurs caractères phénotypiques. Elle est bien adaptée à la détection de micro-organismes entériques sous-dominants mais elle fait l'objet de plusieurs critiques. Ainsi, le choix des micro-organismes à suivre est régulièrement remis en cause. *E. coli* semblerait être un indicateur plus fiable que les coliformes fécaux (Payment et Hartemann, 1998 ; Toranzos *et al.*, 1997). De même, les entérocoques semblent plus résistants au traitement des eaux usées et plus persistants dans l'environnement que les coliformes (Rice *et al.*, 1996 ; Cotta *et al.*, 2003). Toutefois, les entérocoques et *E. coli* persistent moins longtemps dans les sols que les coliphages somatiques ou les *C. perfringens* (Gessel *et al.*, 2004 ; Pourcher *et al.*, 2007). De plus, l'approche culturale ne détecte que les micro-organismes capables de se multiplier sur milieu sélectif. Elle ne permet donc pas de détecter les groupes microbiens encore non cultivés (évalués au moins à 80% des espèces du lisier (Cotta *et al.*, 2003, Amann *et al.*, 1995), ni les groupes cultivés entrés dans un état viable non cultivable, ni même simplement les groupes cultivés pour lesquels aucun milieu sélectif n'existe à ce jour.

Pour tenter de palier ces problèmes, des approches de détection des micro-organismes par des techniques moléculaires sont en cours de développement (Amann *et al.*, 1995). Les plus utilisées sont basées sur l'analyse des gènes codant pour les ARN ribosomiques 16S (ADNr 16S) microbiens. Ces gènes sont devenus l'outil standard d'identification des micro-organismes sans culture car ils sont universels. De plus, au cours de l'évolution des espèces, ils ont accumulé des mutations qui leur donnent une structure particulière composée de régions variables (spécifiques d'une espèce donnée) et de régions conservées (identiques chez toutes les espèces). Les techniques d'identification des micro-organismes tirent parti de cette structure particulière : (i) en ciblant des régions très conservées, il est possible de détecter toutes les espèces d'un échantillon (ii) en ciblant des régions très variables, il est possible de suivre une espèce particulière. Enfin, la comparaison de ces séquences permet l'identification des micro-organismes par analyse phylogénétique.

Deux approches sont généralement distinguées :

(i) l'approche microscopique par FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) (Figure 2). La technique consiste à hybrider des sondes nucléiques sur les cellules bactériennes fixées sur une lame de microscope. Les sondes nucléiques sont des fragments d'ADN simple brin complémentaires d'une séquence présente sur les ARN ribosomiques. Marquées à leur extrémité par une molécule rapporteuse

fluorescente, elles vont pénétrer dans les cellules et s'hybrider aux ARNr (de 10^3 à 10^5 copies par cellule selon les espèces et leur stade physiologique) pour permettre la visualisation des cellules ciblées par microscopie à épifluorescence (Amann *et al.*, 1995). La combinaison de sondes de spécificité différente permet de déterminer l'abondance et la distribution spatiale des cellules ciblées parmi l'ensemble des cellules présentes.

Cette approche suppose que l'on connaisse à l'avance l'identité du micro-organisme que l'on souhaite observer afin de pouvoir développer la sonde qui lui correspond.

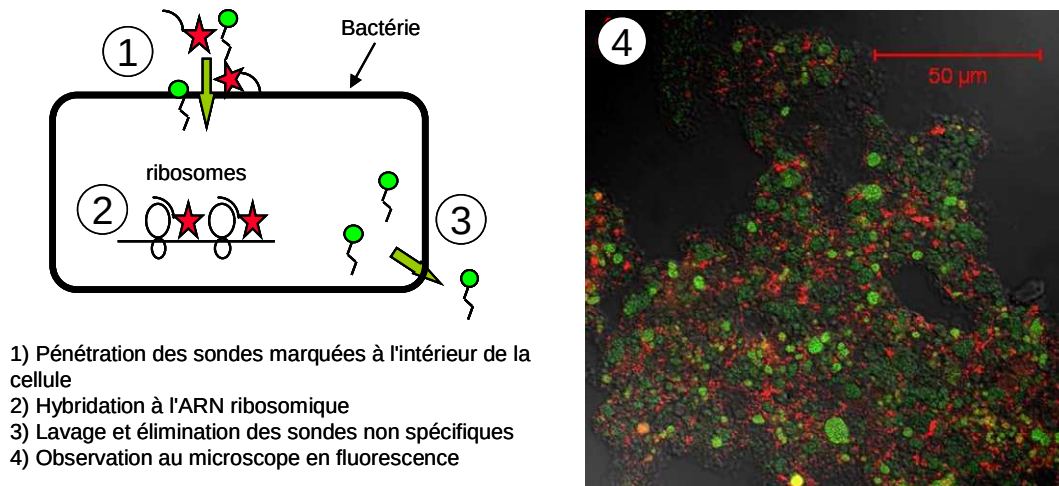


Figure 2 : Principe de l'hybridation *in situ* des ARNr sur cellules entières.

(ii) l'approche de typage moléculaire où les micro-organismes sont détectés par amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN qui leur est spécifique (Figure 3) (Dabert *et al.* 2002). Les ADN sont extraits des échantillons, les gènes codant pour les ARNr sont amplifiés par PCR et les produits de PCR obtenus sont séparés par électrophorèse sur un analyseur génétique. La communauté microbienne apparaît alors sous la forme d'un profil de fragments d'ADN où chaque fragment clairement distinguable correspond à une population dominante de micro-organismes de l'échantillon (voie de gauche Figure 3). La comparaison des profils entre eux permet d'observer rapidement la diversité microbienne des échantillons étudiés. Cette approche permet de travailler sans connaissance préalable des micro-organismes présents dans les échantillons.

L'identification des micro-organismes observés (voie de droite Figure 3) est obtenue par clonage des produits de PCR, tri des clones obtenus à l'aide de la même méthode d'analyse de fragments d'ADN que ci-dessus, puis séquençage des ADN et analyse phylogénétique.

Cette technique de typage moléculaire a été utilisée dans le cadre du GIS Porcherie Verte pour suivre la communauté microbienne d'un lisier dans un élevage pendant 6 mois de stockage anaérobie et de lagunage (Peu *et al.*, 2006). L'analyse a montré la persistance de populations majoritaires originaires de la flore fécale porcine jusqu'au moment de l'épandage. Deux de ces populations ont été identifiées comme des *Clostridium* et *Bacteroides* fécaux à ce jour non cultivés, tandis que quatre autres ont été identifiées comme *Clostridium disporicum*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus*

crispatus et *Streptococcus alactolyticus*. Les résultats ont montré une faible évolution de la communauté microbienne du lisier pendant les phases inertes de stockage et un changement rapide lorsqu'elle passait d'une étape de la filière à une autre.

Cette approche est intéressante car elle permet d'identifier les micro-organismes qui persistent à travers les filières de traitement sans avoir d'a *priori* sur leur identité. Nous avons proposé de l'utiliser, en complément de l'approche culturale habituelle, pour évaluer les capacités d'hygiénisation des filières de traitement des lisiers.

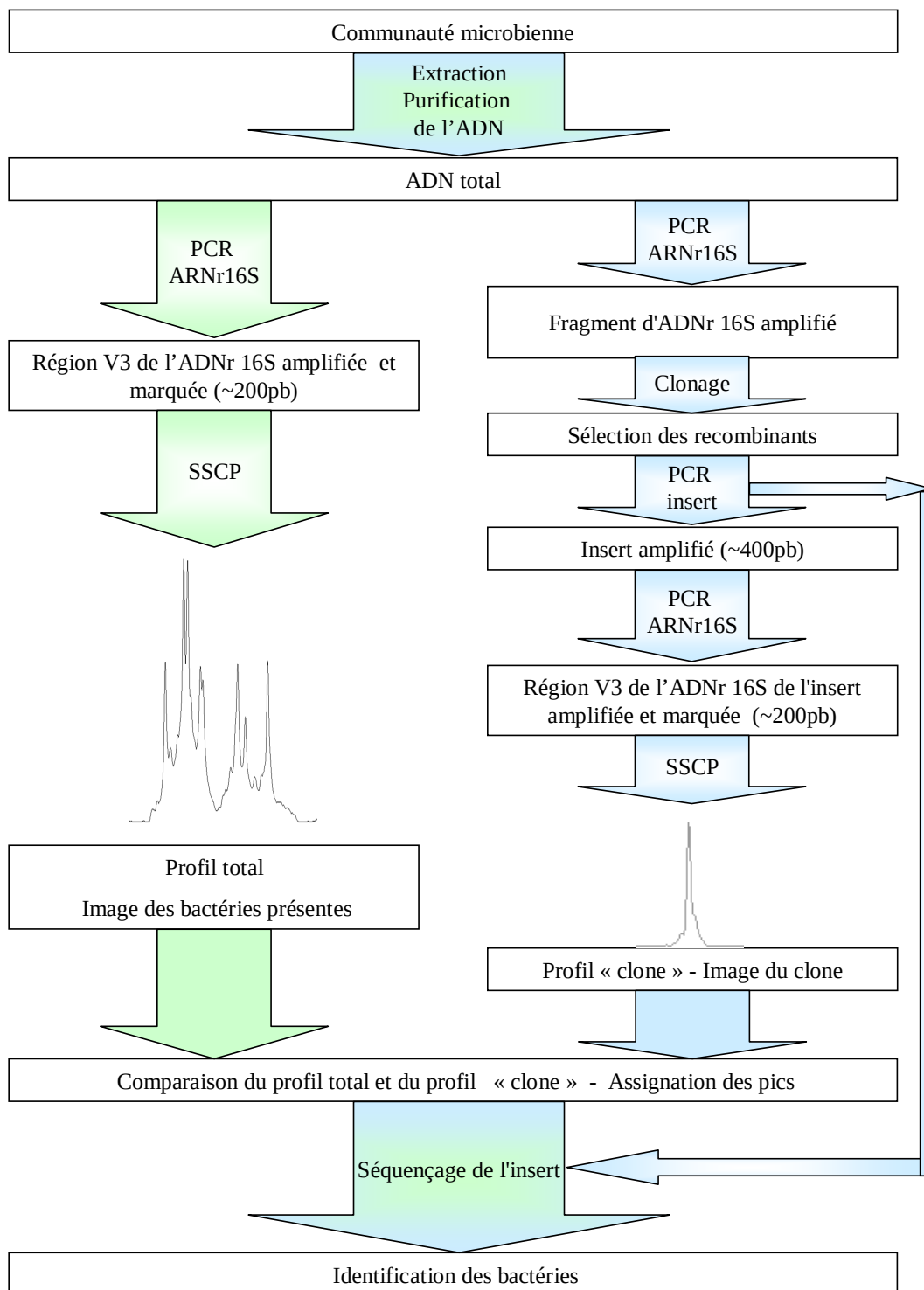


Figure 3 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la stratégie utilisée pour suivre l'évolution d'une communauté microbienne par la méthode de typage moléculaire de PCR des ADNr 16S et CE-SSCP (Capillary electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism, Electrophorèse capillaire et polymorphisme de conformation des ADN simple brin).

1.4. Objectifs de ce projet

Cette étude avait donc trois objectifs pour combler l'absence de données sur le comportement des germes d'intérêt sanitaire au travers des filières actuelles de traitement biologique du lisier porcin.

1. **Evaluer le pouvoir assainissant des technologies actuelles de traitement du lisier de porcs.** Cette évaluation devait être effectuée par une approche de bactériologie classique de dénombrement des germes d'intérêt sanitaire (*Escherichia coli*, entérocoques, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes*) en entrée et sortie de filières de traitement.
2. **Rechercher de nouveaux indicateurs de survie et mettre au point les outils permettant leur quantification.** Cette approche devait mettre en œuvre des techniques de typage moléculaire (PCR de l'ADNr 16S et CE-SSCP) pour suivre sans a priori l'évolution de la communauté microbienne du lisier à travers les filières de traitement afin d'identifier les micro-organismes qui persistent, qu'ils soient cultivables ou non. L'objectif était ensuite de tenter de les quantifier par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou par PCR en temps réel selon les seuils de détection envisagés.
3. **Analyser les étapes importantes pour le processus d'hygiénisation dans les filières actuelles de traitement des lisiers.** Les paramètres physico-chimiques des échantillons devaient être caractérisés afin de permettre une analyse combinée de leur évolution et de celle des populations microbiennes observées par les approches culturales et moléculaires à chaque étape de la filière.

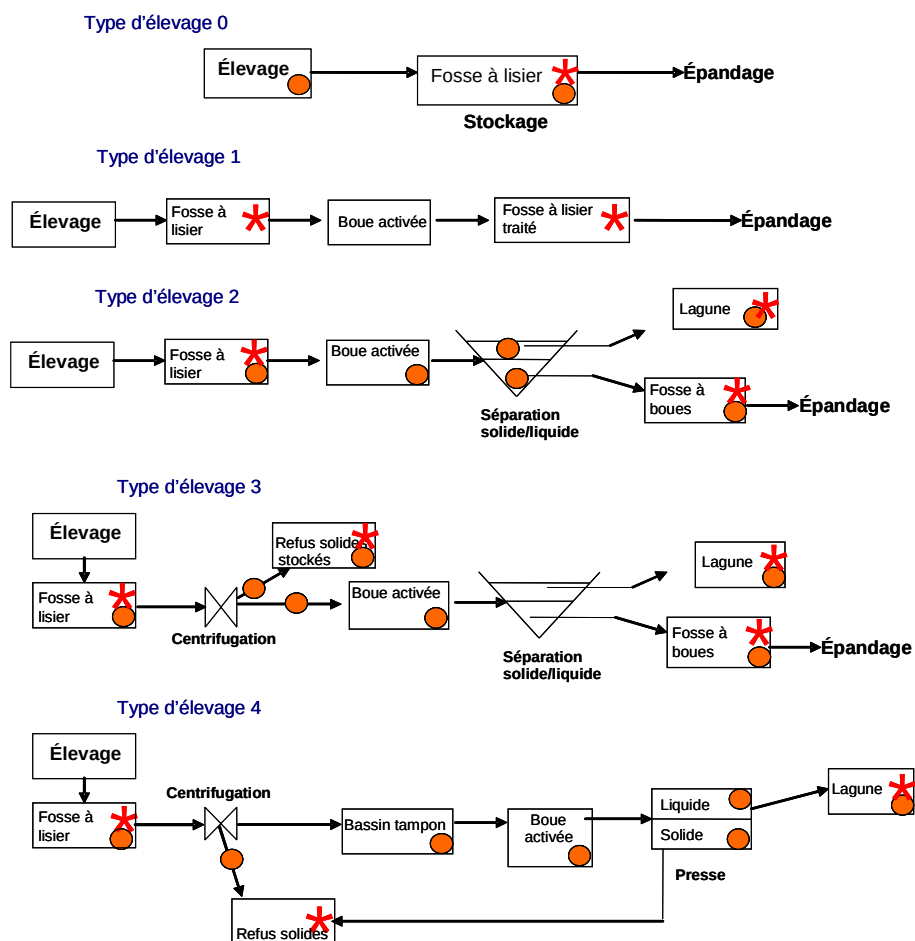


Figure 4 : Schéma des 5 filières étudiées et localisation des points de prélèvement de 2006* et 2007-2008●.

Type 0, stockage simple du lisier sans traitement. Types 1 à 4, les différents types de traitement de lisier.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Mise en place de la campagne de prélèvement

Les élevages de contrôle qui stockent leur lisier et l'épandent sans traitement ont été choisis en collaboration avec Bertrand Le Bris de la Chambre d'Agriculture d'Ille et Vilaine. Les élevages possédant des filières de traitement ont été sélectionnés en collaboration avec Christophe Le Louarn de la société Valétec et Claude Géffrelot de la société Dénitral. Ces deux sociétés sont majoritaires dans les Côtes d'Armor et le Finistère.

Contrairement à notre souhait d'origine, qui était d'évaluer les flux de passage des micro-organismes au travers des différentes étapes des traitements, l'analyse des modes de fonctionnement des filières de traitement nous a montré que les apports discontinus de lisier et l'absence de systèmes de mesure des flux ne permettent pas de faire des suivis en ligne des filières. Nous avons donc choisi de caler nos prélèvements sur les périodes où les effluents sortent de l'élevage afin d'évaluer le transfert potentiel des micro-organismes dans l'environnement ; c'est à dire mars à mai pour l'épandage du lisier stocké et les boues du réacteur biologique, juin-juillet pour l'aspersion des eaux de la lagune et avril à juillet pour l'exportation du refus de séparation.

En 2006, quarante prélèvements ont été réalisés dans 17 élevages porcins d'Ille et Vilaine, des Côtes d'Armor et du Finistère (notés par ordre alphabétique de B à R) représentant les cinq filières de traitement françaises (Figure 4).

Les prélèvements ont été effectués en entrées et sorties des filières, soit pour 4 types de matrices :

- lisier brut non traité, stocké en pré-fosse ou en fosse (notés LB et LS respectivement)
- phase solide du lisier brut, appelée refus de séparation, obtenue après séparation par décanteur centrifuge (notée RS)
- boue stockée en fosse ou en décanteur et provenant d'un traitement biologique (notée BE)
- phase liquide du lisier traité, stockée en lagune après décantation (notée LAG).

Le but était de comparer l'impact de chaque filière de traitement sur plusieurs élevages afin d'évaluer l'efficacité du traitement et d'observer la variabilité intra et inter filière.

Pour les années 2007 et 2008, les prélèvements ont été réalisés à chaque étape des filières de traitement des types 0, 2, 3 et 4 mais sur un seul élevage par type de filière (élevages B, F, K et R de l'année 2006, respectivement). La filière de type 1 a été écartée car elle n'est quasiment plus mise en œuvre. Aux matrices étudiées pour l'année 2006, se sont donc ajoutées :

- les boues du réacteur biologique (notées BA)
- les sorties liquides et solides des décanteurs centrifuges en tête de filière 3 (notées RSL/RSS)
- les sorties liquides et solides des presses en fin de filière 4 (notées BEL/BES)

Au total, 22 prélèvements ont été analysés par année 2007 et 2008. **Les résultats obtenus devaient nous permettre de comparer l'impact de chacune des étapes des filières considérées sur la**

communauté microbienne du lisier et d'observer les variations annuelles des mesures sur une période de 3 ans.

2.2. Réalisation des prélèvements

Pour les prélèvements en fosses de stockage, les lisiers et les boues ont été homogénéisés 30 minutes à 1 heure à l'aide des systèmes en place ou de systèmes amovibles, le plus souvent une hélice marine (figure 5). Quatre prélèvements ont été effectués en 4 zones différentes des fosses ou des lagunes pour obtenir un volume final de 20 à 30 litres. Pour les refus de séparation et les composts, le prélèvement s'est fait par pelletage sur trois fois 0,5 m³ environ et collecte d'une pelletée sur 15. Ensuite, les échantillons ont été prélevés dans ce volume de manière homogène en utilisant la technique de quartage. Les échantillons ont été transportés à température ambiante et analysés pour la bactériologie ou stockés pour la biologie moléculaire dans les cinq heures qui ont suivi leur prélèvement.



Figure 5 : système d'homogénéisation mobile utilisé dans les fosses à lisier

2.3. Analyses physico-chimiques

Pour chaque échantillon, la température a été mesurée sur site. Puis, au laboratoire, les analyses ont été effectuées pour déterminer : le pH, les matières sèches, les matières volatiles et minérales, l'azote ammoniacal, l'azote total, la demande chimique en oxygène (DCO) totale et, pour les liquides, la DCO soluble et les acides gras volatils (AGV) (annexes 1 à 3).

Les matières sèches des échantillons ont été calculées à partir de la différence de poids de 100 mL d'échantillon mesurée avant et après séchage à l'étuve à 105°C jusqu'à masse constante.

Pour les matières volatiles et minérales, 300 mL d'échantillon ont été centrifugés à 17700 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant a été stocké à -20°C pour les mesures sur la fraction soluble. Les culots de matière ont été séchés à l'étuve à 105°C jusqu'à masse constante et pesés pour le calcul des matières volatiles. Puis ils ont été portés à 550°C pendant 3 heures et pesés pour déterminer les matières minérales.

Les mesures de matières organiques et azotées ont été effectuées plus tard à partir des échantillons congelés à -20°C :

- les analyses de l'azote ammoniacal des lisiers ont été effectuées par distillation à la vapeur du produit préalablement basifié (Magnésie) suivie d'une titration. Pour le dosage de l'azote total, l'échantillon a subi une minéralisation [digestion Kjeldahl : chauffage de l'échantillon à 350°C pendant 4 heures en présence d'acide sulfurique concentré (20mL) et d'un catalyseur (Kjeltabs CK : K₂SO₄, CuSO₄ 5H₂O)] suivie d'une distillation - titration de l'échantillon préalablement basifié grâce à l'ajout de soude (30%).
- les déterminations de la demande chimique en oxygène (DCO) et du pH ont été effectuées selon les normes AFNOR NT90101 et NT 90008.
- pour les effluents liquides une détermination des acides gras volatils (AGV) a été effectuée par chromatographie liquide (Peu *et al.*, 2004). Les acides analysés sont l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide butyrique, l'acide isobutyrique, l'acide valérique et l'acide isovalérique.

2.4. Recherche des indicateurs de traitement et des bactéries pathogènes

Les micro-organismes analysés en triplicat correspondent aux indicateurs de traitement (*E. coli*, entérocoques et *C. perfringens*) et à deux germes pathogènes (*Salmonella* sp. et *L. monocytogenes*) (Tableau 1). Les concentrations des germes recherchés sont exprimées en nombre de bactéries par gramme de matières brutes (MB). Les résultats des concentrations moyennes en germes ont été comparés à l'aide du test de comparaison de moyennes de Student.

Tableau 1 : Germes recherchés et méthodes utilisées.

Germe (méthode d'analyse)	Sélection 1	Sélection 2	Confirmation 1	Confirmation 2
<i>E. coli</i> (Dénombrement)	Petrifilm™ "Select <i>E. coli</i> "		Indole (réactif de Kovacks)	
Entérocoques (Dénombrement)	Slanetz et Bartley		Gélose Bile Esculine Azide Agar	
Spores de <i>C. perfringens</i> (NPP 5 tubes selon la norme AFNOR V08 056)	Choc thermique (80°C, 20 min)	Bouillon thioglycolate	Bouillon lactose-sulfite	
Salmonelles (NPP 3 tubes norme AFNOR XP X33-018)	Enrichissement : Cystéine-Sélénite puis Rappaport Vassiliadis	Milieu sélectif de Rambach	Galerie API 20E	
<i>L. monocytogenes</i> (Présence/absence)	Enrichissement : milieu One Broth (OXOID)	Isolement sur gélose ALOA	Milieu Rapid'L. Mono	Détection du gène de virulence <i>hlyA</i> par PCR

2.4.1. Dénombrement de *E. coli* et des entérocoques

Les protocoles de dénombrement d'*E. coli* et des entérocoques sont présentés dans les tableaux 2 et 3.

Tableau 2 : technique de dénombrement d'*E. coli*

Milieu	Pétrifilm select <i>E. coli</i>
Diluant	eau peptonée stérile
Volume ensemencé	1 mL
Principe	Les colonies de <i>E. coli</i> glucuronidase positive, apparaissent bleues
Incubation	24 heures à 44°C
Milieu de confirmation	Eau peptonée exempte d'indole
ensemencement	Repiquage de quelques colonies dans des tubes
Principe	<i>E. coli</i> transforme le tryptophane en indole. Cette réaction est mise en évidence avec du réactif de Kovaks qui réagit avec l'indole en donnant un anneau de couleur rouge.
Incubation	24 heures / 44°C

Tableau 3 : technique de dénombrement des entérocoques

Milieu	Gélose de Slanetz et Bartley
Diluant	eau peptonée stérile
Volume ensemencé	0,1 mL (par étalement)
Principe	L'azide de sodium inhibe la croissance des bactéries Gram négatives. Les entérocoques réduisent le Tri phényl Tetrazolium Chloride (TTC) en formant des colonies roses à marron.
Incubation	48 heures à 37°C
Milieu de confirmation	Bile Esculine Agar
ensemencement	Repiquage des colonies caractéristiques par transfert sur membrane
Principe	Les colonies caractéristiques d'entérocoques apparaissent noires par la dégradation de l'esculine en esculétine.
Incubation	Lecture à 2heures puis 4 heures à 44°C

2.4.2. Dénombrement de *Clostridium perfringens*

Les spores de *C. perfringens* sont dénombrées selon une méthode dérivée de la norme AFNOR V08-056 (Anonyme, 1999). Les deux protocoles sont décrits dans le tableau 4.

Tableau 4 : technique de dénombrement de *C. perfringens*

Solution mère	Dilution de 10 g d'échantillon dans 90 mL d'eau peptonée
Choc thermique	20 min à 80°C puis refroidissement à 45°C
Milieu	Bouillon thioglycolate + supplément de D-cyclosérine
Diluant	eau peptonée
Volume ensemencé	1 mL / tube
Principe	Les agents réducteurs (thioglycolate et cystéine) provoquent une anaérobiose suffisante pour les bactéries anaérobies exigeantes telles que <i>C. perfringens</i> .
Incubation	24 heures / 37°C
Milieu de confirmation	Bouillon lactose sulfite + cloche de Durham
Ensemencement	Repiquage des tubes positifs (transfert de 0,1 mL / tube).
Incubation	24 heures à 46°C
principe	La présence d'un dépôt noir et de gaz traduit une croissance bactérienne
Calcul des concentrations	Technique du NPP 5 tubes par dilution ^a

^a: technique du Nombre le Plus Probable

2.4.3. Dénombrement de *Salmonella* sp.

Les salmonelles sont dénombrées par la technique du NPP trois tubes selon le protocole de la norme AFNOR XP X33-018 (Anonyme, 2004) initialement prévue pour l'analyse des boues de stations d'épuration (tableau 5).

Tableau 5 : protocole de dénombrement de *Salmonella* sp.

Milieu de pré-enrichissement	Milieu Sélénite-Cystéine
Ensemencement	10g, 1g et 0,1g de lisier ou boues ensemencés en triplicat
Principe	Le sélénite inhibe la croissance des bactéries coliformes et des entérocoques dans les 12 heures qui suivent le début de l'incubation.
Incubation	24 heures à 37°C
Milieu d'enrichissement	Milieu Rappaport
Principe	La sélectivité est due au vert malachite, le $MgCl_2$ et le pH acide
Volume ensemencé	0,1 mL de milieu Sélénite-Cystéine
Incubation	24 heures / 36,5°C
Milieu d'isolement	Milieu Rambach agar
Ensemencement	Isolement à l'öse à partir du milieu Rappaport
Principe	Les <i>Salmonella</i> produisent de l'acide en dégradant le propylène glycol (précipitation du rouge neutre à pH acide). Les colonies de <i>Salmonella</i> prennent une coloration rouge fuchsia.
Incubation	24 heures à 37°C
Confirmation	Tests: ONPG, H_2S , Urée-indole.

Les colonies isolées correspondant aux critères des salmonelles sont conservées en vue d'un sérotypage.

2.4.4. Recherche de *Listeria monocytogenes*

La présence de *Listeria monocytogenes* dans les échantillons est mise en évidence selon le protocole proposé par la société OXOID pour la recherche des salmonelles dans les produits alimentaires (tableau 6).

Tableau 6 : protocole de recherche de *L. monocytogenes*

Milieu d'enrichissement	One Broth
Ensemencement	Ensemencement de 25g de lisier ou boues dans 225 mL de bouillon ONE BROTH
Incubation	24 heures à 30°C
Milieu d'isolement	Listeria Brilliance Agar
Ensemencement	Isolement à l'öse
Principe	Le chromogène X-glucoside permet l'identification présomptive de <i>Listeria</i> (β -galactosidases positives) qui apparaissent bleues. <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. ivanovi</i> produisent une phospholipase lecithinase qui clive la lécithine du milieu formant un halo blanc opaque autour des colonies.
Incubation	48 heures à 37°C
Milieu de confirmation	Rapid'L Mono
Ensemencement	Repiquage à l'öse de colonies spécifiques
Principe	Le milieu permet la détection chromogénique d'une phospholipase C produite par <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. ivanovi</i> . La différenciation de ces deux espèces est basée sur la capacité d'acidification du xylose. Les colonies de <i>L. monocytogenes</i> qui n'acidifient pas le xylose, apparaissent bleues sans halo.

Les colonies caractéristiques de *L. monocytogenes* sont conservées sur une gélose non sélective et confirmées par la mise en évidence du gène de virulence *hlyA*, spécifique de cette espèce pathogène selon un protocole adapté des travaux de Bohnert *et al.* (1992) (Annexe 4).

Les souches de *L. monocytogenes* et de salmonelles ont été sérotypées à l'AFSSA de Ploufragan. Le sérotypage des salmonelles est réalisé selon le schéma de Kauffmann-White. Le sérotypage des *L. monocytogenes* est effectué par la recherche des antigènes somatiques et flagellaires par des techniques d'agglutination.

Les données ont été analysées en utilisant le test de comparaison de moyennes (test de Student) et le test d'indépendance entre deux variables quantitatives (test de la pente).

2.5. Analyse des communautés microbiennes par FISH

Les échantillons ont été fixés puis lavés selon Amann *et al.* (1990) puis stockés à -20°C en attente d'hybridation.

2.5.1. Fixation des échantillons

L'étape de fixation des cellules a pour objectif de stopper l'activité des cellules tout en protégeant leur structure membranaire. Deux types de fixation utilisant le paraformaldéhyde ou l'éthanol ont été testés (Amann *et al.*, 1990). Pour la fixation au paraformaldéhyde 4% (PFA), 4 mL d'échantillon ont été additionnés de 12 mL de PFA 16% et stockés à 4°C pendant 2h30. Les cellules ont été récupérées par centrifugation 20 min. à 7 000 g. Le culot a été lavé une fois avec un tampon phosphate (PBS 1X) puis reformé par une nouvelle centrifugation. Le culot lavé a été repris dans 2 mL de PBS 1X, additionné de 2 mL d'éthanol absolu et stocké à -20°C. Pour la fixation à l'éthanol, 4 mL d'échantillon ont été simplement lavés au PBS 1X et stockés en PBS:Ethanol (1:1) comme décrit ci-dessus.

2.5.2. Hybridation des échantillons

Des volumes de 20 µL d'échantillon ont été déposés sur des lames à 10 puits avec une surface en téflon préalablement traitées pour favoriser l'attachement cellulaire. Ils ont été séchés 30 min. au four à 46°C puis déshydratés par 3 bains successifs de 3 min. en éthanol 50%, 80% et 96%. L'hybridation a été effectuée sur lame pendant 1h30 à 46°C selon Amann *et al.* (1990) avec 10 µL de solution d'hybridation à 20% de formamide et 50 ng de sonde par puits (Annexe 5). Après 10 min de lavage à 48°C, les lames ont été montées avec une goutte de Citifluor (solution limitant l'extinction des fluorophores) dans chaque puits et une lamelle. Quatre sondes ont été utilisées dans le cadre de cette étude (Tableau 7). Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (MCBL) Zeiss.

Tableau 7 : Spécificité des sondes utilisées dans l'étude

Sonde	Cible	Séquence sonde (5'-3')	% formamide	Fluorophore	Référence
EUB338 I	Plupart des Bactéries	GCTGCCTCCCGTAGGAGT			Amann <i>et al.</i> ¹
EUB338 II	Planctomycétales	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	Cy3	Daims <i>et al.</i> ²
EUB338 III	Verrucomicrobiales	GCTGCCACCCGTAGGTGT			Daims <i>et al.</i> ³
Arc915	Archées	GTGCTCCCCGCGCAATTCCT	0	Cy5	Stahl <i>et al.</i> ⁴

2.6. Suivi des communautés microbiennes par typage moléculaire

Les communautés microbiennes des échantillons ont été analysées par amplification PCR des gènes codant pour les ARNr 16S microbiens et analyse des séquences obtenues.

2.6.1. Méthodologie

La figure 3 (page 15) rappelle la stratégie mise en œuvre lors de cette approche. Elle vise à analyser la structure des communautés microbiennes des échantillons par la collecte et la comparaison des gènes codant pour les ARN ribosomiques 16S (ADNr 16S) microbiens (Dabert *et al.*, 2002)

Les groupes microbiens ciblés sont les bactéries totales et les groupes dominants des lisiers. Pour les bactéries totales, la région V3 des ADNr 16S a été amplifiée par PCR directe à l'aide d'amorces bactéries générales (Annexe 6). Pour l'analyse des groupes de bactéries lactiques (*Bacillus-Streptococcus-Lactobacillus*, BSL), *Clostridium-Eubacterium* (CE) et *Bacteroides-Prevotella* (BP), une 1^{ère} PCR ciblant chacun des groupes a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques. Puis les produits de PCR obtenus ont été utilisés pour une seconde PCR réalisées dans les mêmes conditions que pour les bactéries totales.

L'analyse des produits de PCR a été réalisée par électrophorèse capillaire SSCP en polymère non dénaturant à l'aide d'un analyseur génétique ABI 310. Les résultats obtenus sont des profils de pics où chaque pic clairement distinguable correspond à une population dominante de micro-organismes de l'échantillon (voie de gauche Figure 3). La hauteur de chaque pic dépend de sa proportion dans l'échantillon. La comparaison des profils entre eux permet d'observer rapidement la diversité microbienne des échantillons étudiés.

1 Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919-1925, 1990.

2 The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Syst. Appl. Microbiol. 22: 434-444, 1999.

3 The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Syst. Appl. Microbiol. 22: 434-444, 1999.

4 Development and application of nucleic acid probes. 205-248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1991.

L'identification des pics observés (voie de droite Figure 3) est réalisée par clonage des produits de PCR chez *Escherichia coli*. La banque de clones obtenue est alors triée par amplification des fragments d'ADN clonés et électrophorèse SSCP de manière à n'obtenir qu'un seul pic bien individualisé par clone. Les pics ainsi observés sont comparés avec les profils des échantillons analysés pour être assignés et leur ADN est séquencé afin d'identifier la bactérie correspondante.

2.6.2 Matériels biologiques et extractions d'ADN

Les échantillons ont été stockés à -20°C sous la forme de culots de centrifugation (10 minutes à 17700 g) ou d'aliquots de 200 à 300 mg dans des microtubes de 2 mL.

Au moment de l'extraction d'ADN, les culots congelés ont été repris dans 1,4 mL de tampon de lyse du kit QIAAMP DNA stool (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le protocole du kit sauf pour l'élution finale qui a été effectuée dans deux fois 50 µL d'eau ppi. L'intégrité de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse en gel de Tris-Borate 40 mM, 1 mM EDTA, pH 8.3, agarose à 1,5% et coloration au bromure d'éthidium (15 µg/100 mL de gel). L'ADN a été stocké à -20°C.

2.6.3. PCR (Réactions de polymérisation en chaîne)

Pour les bactéries totales, la région V3 des ADNr 16S a été amplifiée par PCR directe à l'aide des amorces GE 04 (Bactéries) et GE 06 (universelle) et de la *Pfu* turbo polymérase (Stratagene). Les mélanges réactionnels et les conditions de PCR sont présentés dans les tableaux 2, 3 et 4.

Pour l'analyse des groupes de bactéries lactiques (*Bacillus-Streptococcus-Lactobacillus*, BSL), *Clostridium-Eubacterium* (CE) et *Bacteroides-Prevotella* (BP), une 1^{ère} PCR ciblant chacun des groupes a été réalisée à l'aide de la polymérase AccuPrime (Invitrogen) et des amorces GE08 (BSL), GE 09 (CE) ou GE10 (BP) couplées à l'amorce universelle GE 01. Les produits de PCR obtenus ont été utilisés pour une seconde PCR de type bactéries totales réalisée dans les conditions décrites ci-dessus (tableaux 8 à 10).

Tableau 8 : Caractérisation des amorces utilisées pour amplifier l'ADNr 16S

	Séquence des amorces (5'-3')		Position <i>E. coli</i>	Cibles	Référence
GE 01	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	F	9	16S Bactéries	Godon <i>et al.</i> 1997
GE 03	GNTACCTTGTTACGACTT	R	1509	16S Bactéries	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
GE 04	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	F	330	16S V3 Bactéries	Delbès <i>et al.</i> , 2001
GE 06	*TTACCGCGGCTGCTGGCAC	R	500	16 S V3 Universelles <i>Lactobacillus</i> spp.	Delbès <i>et al.</i> , 2001
GE 08	ATTYCACCGCTACACATG	R	679	<i>Pediococcus</i> spp, <i>Leuconostoc</i> spp, <i>Weissella</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	Heilig <i>et al.</i> , 2002
GE 09	CCCTTTACACCCAGTAA	R	561	<i>Clostridium</i> & <i>Eubacterium</i>	Wood <i>et al.</i> , 1998
GE 10	TCACCGTTGCCGGCGTACTC	R	887	<i>Bacteroides</i> & <i>Prevotella</i>	Van Dyke <i>et al.</i> , 2002
GE 11	TAATACGACTCACTATAGGG		ADN plasmidique		
GE 12	GACCATGATTACGCCA		ADN plasmidique		

* marqué avec un fluorophore 6-FAM (nom commun de la carboxyfluorescéine)

Avec Y = C/T, M = A/C, F = forward et R = reverse

Tableau 9 : Préparation pour les réactions de PCR

Produit	PCR-SSCP	PCR bactéries lactiques	PCR <i>Clostridium</i>	PCR <i>Bacteroides</i>
Enzyme polymérase	<i>Pfu</i> Turbo® 0,2 µL à 5U/µL	<i>AccuPrime</i> ® 0,5 µL à 5 U/µL	<i>AccuPrime</i> ® 0,5 µL à 5 U/µL	<i>AccuPrime</i> ® 0,5 µL à 5 U/µL
Tampon dNTP	2 µL à 10X 4 µL à 2,5 mM	2,5 µL à 10X	2,5 µL à 10X	2,5 µL à 10X
Amorce GE 01		0,5 µL à 100 ng/µL	0,5 µL à 100 ng/µL	0,5 µL à 100 ng/µL
Amorce GE04	0,5 µL à 100 ng/µL			
Amorce GE 06	0,5 µL à 100 ng/µL			
Amorce GE 08		0,5 µL à 100 ng/µL		
Amorce GE 09			0,5 µL à 100 ng/µL	
Amorce GE 10				0,5 µL à 100 ng/µL
ADN	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Eau stérile	14.2 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Tableau 10 : Paramètres des PCR effectuées sur le thermocycler MJ mini (Bio-Rad)

	Types de PCR	PCR Bactéries totales	PCR Bactéries lactiques	PCR <i>Clostridium</i>	PCR <i>Bacteroides</i>
	Etapes	Température -Durée	Température -Durée	Température -Durée	Température -Durée
Cycle	Dénaturation initiale	94°C-2min	94°C-2min	94°C-2min	94°C-2min
	Dénaturation	94°C-30sec	94°C-30sec	94°C-30sec	94°C-30 sec
	Hybridation	61°C-30sec	61°C-30sec	55°C-30sec	55°C-30sec
	Élongation	72°C-30sec	68°C-1,5min	68°C-1,5min	68°C-1,5min
	Élongation finale	72°C-10min	/	/	/
	Nombre de cycles	25	30	30	30

A chaque étape de PCR, la taille des produits de PCR attendue a été vérifiée en déposant 10 % du produit de réaction sur un gel d'électrophorèse d'agarose à 2%, en parallèle d'un marqueur de taille (100 pb ladder Promega).

2.6.4. *Electrophorèse capillaire single strand conformation polymorphism (CE-SSCP).*

Les régions V3 des micro-organismes ne présentent pas de différence de taille suffisante pour être résolues en gel d'agarose. En conséquence, l'analyse des produits de PCR est réalisée par électrophorèse SSCP (Delbès *et al.*, 2001).

Les produits de PCR sont dilués avec de l'eau ppi en fonction de l'intensité des bandes observées sur les gels d'agarose. Un μL des produits dilués est mélangé à 18,8 μL de formamide (Genescan-Applied Biosystems) et 0,2 μL du marqueur de taille GS rox (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'ADN est dénaturé à 95°C pendant 5 minutes puis stocké pendant au moins 10 minutes dans de la glace mélangée avec de l'eau. Les produits de PCR sont séparés selon leur conformation par électrophorèse en polymère non dénaturant (5,58 Conformation Analysis Polymere, Applied biosystems) et 10 % de Glycérol (Sigma) à l'aide d'un analyseur génétique à capillaire (47cm par 50 μm) ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les migrations dont la durée est de 30 minutes par échantillon sont effectuées sous un voltage de 12 kV à 32°C avec un tampon de migration (tampon 1x, Applied biosystems et 10 % de Glycérol, Sigma). Les molécules d'ADN simple brin forment alors des structures secondaires en fonction de leur séquence nucléotidique par appariement de séquences complémentaires. Les molécules d'ADN sont détectées grâce au marquage fluorescent de l'amorce GE 06. Le marqueur de taille GS rox ajouté à chaque échantillon permet de compenser les différences de migration d'un échantillon à un autre grâce au logiciel d'analyse de données de l'analyseur (GENE MAPPER v4.0).

2.6.5. *Identification des pics observés en CE-SSCP :*

L'identification des pics observés en CE-SSCP a été effectuée pour deux échantillons de lisier brut (LB H et O) et deux échantillons de boues (BE N et O) selon 5 étapes (Delbès *et al.*, 2001) :

Amplification des fragments d'ADNr 16S à cloner.

Pour les groupes BSL, CE et BP, le clonage a été effectué à partir des produits de PCR obtenus précédemment à l'aide des amorces GE08, GE 09 ou GE10 couplées à l'amorce universelle GE 01. Pour les pics observés sur les profils de "bactéries totales", une amplification de l'ADNr 16S a été réalisée avec le couple d'amorces GE01/GE03. La composition du mélange réactionnel est la suivante : dNTP 0,2 mM, amorces 4 ng. μL^{-1} , RedTaq polymerase (Sigma, St Louis, MO) : 2,5 U, Tampon 1X, QSP eau 24 μL , 1 μL d'ADN total dilué au 5ème. Les conditions de réaction sont : dénaturation 94 °C 2 min, puis 25 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 50 °C et 1min à 72 °C, suivis d'une élongation finale de 10 min à 72 °C.

Purification des produits de PCR.

Les produits de PCR obtenus ont été purifiés sur colonne avec le Kit Promega Wizard PCR Clean-Up system (Promega, Madison, WI) puis concentrés par précipitation à l'éthanol : les produits de PCR ont été élués des colonnes de purification dans 50 µL d'eau ppi. L'éluat a été concentré 8 fois par ajout de 5 µL d'acétate de sodium 5 M pH 5.2 et de 125 µL d'éthanol absolu, stockage dans la glace pendant 10 min, puis centrifugation à 13 000 g pendant 15 min. Le culot a été lavé avec 250 µL d'éthanol 70 % puis repris dans 6 µL d'eau ppi.

Clonage.

Les produits de PCR purifiés et concentrés ont été clonés dans *E.coli* à l'aide du kit StrataClone PCR cloning de Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA) selon les recommandations du fabricant, mis à part le temps de ligature qui a été allongé à 15 min. La sélection des clones recombinants a été effectuée par étalement sur milieu LB ampicilline à 10 mg.mL⁻¹ et Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside) à 80 µg.mL⁻¹. Les clones avec un insert apparaissent blancs sur la gélose tandis que les clones sans inserts sont bleus.

Tri des clones et leur séquençage.

Des séries de 24 PCRs ont été effectuées sur les colonies blanches obtenues pour chaque clonage, de manière à amplifier l'ADN cloné. Les conditions de PCR sont : dNTP 0,2 mM, amorces GE11/GE12 : 4 ng.µg⁻¹, RedTaq polymérase 2,5 U, eau QSP 20 µL. Chaque colonie est prélevée à l'aide de cônes stériles et dispersée dans le tube contenant le mélange réactionnel. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation 94 °C 10 min, 25 cycles de 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, avec une élongation finale de 10 min à 72 °C. Les produits de PCR obtenus ont été dilués 200 fois et utilisés comme substrat pour une réaction de PCR-SSCP à l'aide des amorces GE04/GE06 comme décrit précédemment. Le profil SSCP obtenu pour chaque clone a été comparé au profil obtenu pour le groupe ciblé. Les clones qui ont co-migré avec les pics recherchés ont été séquencés à la plateforme Ouest Génopole de Roscoff (Station biologique du CNRS).

Identification des clones.

Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences d'ADN présentes dans les bases de données internationales (Genbank) grâce au logiciel BLAST Nucleotide du National Center for Biotechnologies Informations (www.ncbi.nih.gov) et au Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Tableau 11 : Comparaison des paramètres physico-chimiques des effluents analysés en 2006, 2007 et 2008.

		Moyenne (min-max)								
	Nombre élevages	pH	MS en %	NTK gN/L	NH ₄ ⁺ gN/L	% NH ₄ ⁺ /NTK	DCOt _{tot} gO ₂ /L	DCOs _{sol} gO ₂ /L	% DCOs _{sol} /tot	AGV _{tot} g/L
Lisier brut										
2006	12	7,8 (7,6-7,9)	4,5 (2-6,1)	4,3 (3-5,8)	3 (2,2-4,2)	70 (67-75)	48 (13,6-82,9)	9 (4,3-17,1)	19 (12-32)	2,4 (0,1-5,9)
2007	4	7,6 (7,3-7,9)	6,2 (4,6-9,4)	4,5 (4,1-5,4)	2,7 (2,6-2,9)	61 (54-65)	55 (32,8-84,1)	13 (7,7-18,8)	27 (15-57)	4,5 (1,8-8,9)
2008	4	7,7 (7,0-8,0)	4,9 (2,5-8,6)	4,3 (3,2-5,9)	2,7 (2,1-3,6)	64 (61-68)	32 (27-96)	16 (6,8-26,3)	29 (26-33)	3,4 (0,1-6,7)
Lisier stocké										
2006	5	7,7 (7,4-8)	4,4 (3,1-5,8)	4,2 (3,2-5,5)	3 (2,2-4)	70 (56-86)	54 (34,5-66,1)	10 (6,7-11,3)	20 (10-31)	2,8 (0-8,8)
2007	1	7,7	4,6	4,6	3	64	61	20	33	9,6
2008	1	7,5	1,9	3,2	2,6	79	23	14	62	6,5
Boues stockées										
2006	10	7,5 (7,1-8,2)	5,1 (1,9-9,1)	2 (0,9-3)	0,4 (0,1-0,8)	22 (11-48)	41 (14,4-73,5)	2,4 (1,5-3,4)	7 (4-11)	0,3 (0-1)
2007	2	7,2 (7,2-NR)	8,1 (5,9-10,3)	2,1 (2,1-2,2)	0,3 (0,3-0,3)	13 (12-14)	28 (5,1-50)	2,4 (2,2-2,5)	27 (4-49)	0,1 (0,1-0,1)
2008	2	8,6 (7,1-10,0)	6,5 (3,1-9,8)	2,4 (1,8-3,0)	0,3 (0,2-0,5)	13 (9-16)	30 (22,5-38,0)	2,7 (1,9-3,5)	10 (5-15)	ND
Lagunes										
2006	8	9,3 (8,9-9,6)	0,7 (0,6-0,8)	0,1 (0-0,1)	0,02 (0,02-0,04)	32 (14-53)	1,9 (0-3,2)	NR	NR	
2007	3	8,8 (8,8-8,9)	0,6 (0,4-0,8)	0,2 (0,1-0,3)	ND	NA	5,9 (2,6-9,2)	1,1 (0,5-1,7)	35 (5-65)	
2008	3	8,9 (8,4-9,5)	1,0 (0,7-1,6)	0,1 (0-0,2)	ND	NA	1,6 (0,8-2,5)	1,2 (0,6-1,7)	71 (67-75)	
Refus solide de centrifugation stocké										
2006	5	NR	36 (24-44)	14 (7,5-17,3)	4,8 (0,7-7,2)	33 (10-42)	276 (99-437)			
2007	1	NR	36	17	6,4	37	401			
2008	1	NR	36	13	4,9	38	278			

NR, non réalisé ou non réalisable ; NA, non applicable ; ND, non détecté (inférieur au seuil de la méthode : 0,01 gN-NH₄⁺/L ou 0,05 gAGV/L)

3. RESULTATS

3.1. Caractérisation physico-chimique des prélèvements.

3.1.1. Résultats par type de prélèvement

Les paramètres physico-chimiques des prélèvements sont présentés en annexes 1 à 3 et synthétisés dans le tableau 11. Les valeurs obtenues pour les campagnes de 2007 et 2008 sont comparables à celles obtenues en 2006 pour les mêmes matrices et restent dans la gamme de variabilité des mesures généralement observées pour les effluents d'élevage et pour les différents types de traitement (Loyon *et al.*, 2003 ; Levasseur P., 1998).

Dans l'ensemble ces mesures confirment :

- Les fortes concentrations en matières sèches (3 à 6%), en azote (environ 4,5 g/L dont 60 à 70% sous forme ammoniacale) et en DCO (30 à 55 gO₂/L dont 20 à 30% sous forme soluble) des lisiers bruts
- La faible variation des paramètres MS, azote et DCO_{tot} entre les lisiers bruts (moins de 1 mois de stockage) et stockés (plus de 3 mois de stockage), le stockage anaérobie n'étant pas un procédé actif de traitement
- L'impact des traitements biologiques qui conduisent à de faibles teneurs en azote et en DCO_{sol} dans les boues stockées et à de très faibles teneurs en azote et DCO_{tot} dans les eaux des lagunes
- Le pH plus élevé des lagunes (autour de 9) par rapport aux lisiers et aux boues (pH 7 à 8)
- La concentration des MS et d'une partie de la DCO et de l'azote dans les refus solides de centrifugation stockés dont les teneurs moyennes sont : MS 36%, azote NTK 15 gN/L dont 36% sous forme ammoniacale, et DCO_{tot} environ 320 gO₂/L.

3.1.2. Résultats par filière

L'analyse des filières étape par étape permet de valider l'intérêt des opérations unitaires mises en œuvre dans les procédés (Tableaux 12 à 15 ci-dessous). **Filière de Type 0** (Tableau 12). Les moyennes calculées à partir des valeurs d'abattement obtenues en 2006, 2007 et 2008 montrent une solubilisation de la matière organique pendant le stockage du lisier. Pour chaque année, les quantités de solides évaluées par mesure des matières sèches, du NTK et de la DCO_{tot} diminuent au profit des produits solubles tels que l'ammonium, la DCO_{sol} et les acides gras volatiles. Une partie de l'ammonium est perdue pendant le stockage sous la forme d'ammoniac volatil (4 à 6 gN/m²/j selon Loyon *et al.*, 2003) tandis que le reste est assimilé par les micro-organismes. En l'absence de traitement aérobie, des quantités importantes d'ammonium et d'AGV persistent dans le lisier.

Tableau 12. Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées du lisier brut et du lisier stocké en % de lisier brut.

TYPE 0	Nb prélèvements	MS	NTK	NH ₄ ⁺	DCO tot	DCO sol	AGV tot
Lisier brut	3	100	100	100	100	100	100
Lisier stocké	2 ou 3	35 (22-49)	68 (55-86)	85 (72-102)	49 (24-73)	93 (55-130)	102 (96-108)

Filière de Type 2 (Tableau 13). La filière de type 2 possède un traitement biologique du lisier suivi d'un décanteur qui permettent successivement une élimination de l'azote ammoniacal du lisier et une séparation des phases liquides et solides du lisier traité. Les mesures effectuées montrent une dégradation de la matière organique qui conduit à une réduction de la quantité d'azote organique et ammoniacal, de la DCO totale et soluble, et enfin des AGVs qui restent à des teneurs très basses tout au long de la filière. L'alternance des phases aérobie/anoxie du procédé biologique permet donc l'élimination efficace des matières carbonées et de l'azote organique du lisier par ammonification, nitrification et dénitrification. L'étape de décantation permet ensuite de concentrer les MS dans les boues et de stocker séparément les phases solides et liquides du lisier traité en attente d'épandage. Après un stockage de plusieurs mois, ces boues contiennent 2 à 3 fois moins de DCO totale et d'azote total (NTK) que le lisier brut initial alors que leur teneur en matières sèches a doublée. Comparé au simple stockage anaérobie de la filière de type 0, le traitement aérobie permet donc de diviser les teneurs en azote ammoniacal et en AGV par un facteur 10 et 25 respectivement, par rapport au lisier brut initial (Tableau 11). Dans l'eau des lagunes utilisée en irrigation, la concentration en azote ammoniacal est indétectable (inférieure à 0,01 gN-NH₄⁺/L).

Tableau 13. Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées des différents prélèvements par rapport au lisier brut initial (en % de lisier brut).

TYPE 2	Nb prélvts.	MS	NTK	NH ₄ ⁺	DCO tot	DCO sol	AGV tot
Lisier brut	3	100	100	100	100	100	100
Boue activée	2 ou 1	98 (89-107)	33 (30-35)	7 (6-8)	52 (12-92)	38	3
Boue du décanteur	1	137	53	11	129		4
Boues stockées	3, 2 ou 1	204 (190-213)	61 (45-71)	14 (9-16)	80 (10-187)	43 (32-54)	4
Liquide du décanteur	1	22	4	1	13		
Lagune	3	16 (15-17)	3,7 (2-6)	ND (ND-ND)	5 (5-5)	22	2

ND : non détecté (inférieur au seuil de la méthode : 0,01 gN-NH₄⁺/L).

Filière de Type 3 (Tableau 14). Cette filière se distingue de la précédente par la présence d'un décanteur centrifuge en amont du bassin de traitement biologique. Il permet la séparation du lisier brut en une phase liquide (Refus liquide après centrif.) qui est ensuite dirigée vers le bassin d'aération et une phase solide (Refus solide après centrif.) qui est stockée en tas à l'abri des intempéries. Il est important de souligner que les mesures présentées ici correspondent aux teneurs des produits en entrée et sortie du décanteur centrifuge mais qu'il n'est pas possible de faire un bilan matière sur cette opération, car nous n'avons pas accès aux volumes entrant dans l'appareil ni à la répartition des différentes phases du lisier de volume à volume. Les résultats obtenus montrent néanmoins que les MS s'accumulent logiquement dans le refus de séparation solide entraînant avec elles une partie de l'azote organique et de la DCO_{tot}. La proportion d'azote ammoniacal par rapport au NTK est réduite dans le refus de séparation solide par rapport au lisier brut puisqu'elle est de 30% et 33% en 2007 et 2008 respectivement (Annexes 1 à 3) contre 65% en moyenne dans le lisier brut (Tableau 11).

Tableau 14. Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées des différents prélèvements par rapport au lisier brut initial (en % de lisier brut).

TYPE 3	Nb prélvts.	MS	NTK	NH ₄ ⁺	DCO tot	DCO sol	AGV tot
Lisier brut	3	100	100	100	100	100	100
Refus liquide après centrif.	2	53 (41-64)	86 (83-88)	98 (96-99)	54 (46-61)	64 (11-117)	98 (94-102)
Refus solide après centrif.	2	965 (773-1156)	324 (310-337)	162 (161-162)	679 (175-1182)	NA	NA
Boue activée	2	60 (43-76)	63 (29-96)	3 (2-4)	47 (37-56)	25 (24-25)	ND
Boues stockées	3	132 (124-146)	54 (53-55)	10 (7-13)	82 (10-141)	25 (20-27)	2 (ND-6)
Lagune	3	31 (11-64)	4 (2-6)	0,3 (ND-1)	5 (4-6)		ND (ND-ND)
Refus solide stocké	3 ou 2	1101 (775-1424)	410 (395-422)	247 (234-259)	935 (786-1083)	NA	NA

NA : non applicable, ND : non détecté (inférieur au seuil de la méthode : 0,05 g/L).

Comme précédemment, (1) l'azote ammoniacal et les AGV disparaissent au niveau du traitement biologique, (2) les boues stockées destinées à l'épandage contiennent une teneur réduite en NTK, ammonium et DCO, et (3) l'eau des lagunes utilisée en irrigation contient des teneurs très basses en azote et matière organique. Le refus solide de centrifugation stocké est au contraire concentré en matière organique. Il est exporté de l'exploitation pour être composté avec d'autres déchets. Il semble que le stockage n'influe pas sur son ratio NH₄⁺ / NTK puisque les teneurs en NH₄⁺ demeurent en moyenne autour de 36% après stockage (Tableau 11).

Filière de Type 4 (Tableau 15). Cette filière se distingue de la précédente par la mise en place d'une séparation mécanique des boues activées du bassin de traitement biologique à l'aide d'une presse, en remplacement du décanteur de la filière de type 3. D'autre part, les boues pressées et les refus solides de centrifugation ne sont stockés sur le site que temporairement (moins de 3 mois). Ils sont mélangés et exportés vers une plate forme de compostage. Les données présentées correspondent donc aux produits fraîchement centrifugés ou pressés.

Tableau 15. Comparaison des concentrations moyennes en matières azotées et carbonées des différents prélèvements par rapport au lisier brut initial (en % de lisier brut).

TYPE 4	Nb prélvts.	MS	NTK	NH ₄ ⁺	DCO tot	DCO sol	AGV tot
Lisier brut	2	100	100	100	100	100	100
Refus liquide après centrif.	2 ou 1	72 (63-80)	98 (94-102)	103 (102-104)	103 (75-131)	71	26
Refus solide après centrif.	3 ou 2	641 (618-895)	214 (189-238)	75 (33-117)	899 (648-1149)	NA	NA
Boue activée	2	49 (35-63)	19 (17-21)	2 (2-2)	34 (30-38)	4,5 (4-5)	ND
Boues pressées	2	344 (273-415)	175 (156-193)	4,5 (4-5)	199 (165-233)	NA	NA
Liquide boues pressées	2	18 (12-23)	3 (2-4)	1 (1-1)	5 (1-9)	7 (5-9)	ND
Lagune	3 ou 2	12 (7-18)	2 (1-3)	ND (ND-ND)	10 (0,5-28)	4 (3-5)	ND

NA : non applicable, ND : non détecté (inférieur au seuil de la méthode : 0,05 g/L).

Dans l'ensemble, les valeurs obtenues sont similaires à celles de la filière de type 3 mise à part une plus forte concentration en solides dans les boues pressées comparé aux simples boues décantées et stockées des types 2 et 3. On notera cependant un abattement apparent plus faible de toutes les matières analysées sauf les AGV pour la filière de type 4 entre le lisier brut et le refus liquide après centrifugation comparé aux filières précédentes. Cette observation pourrait être la conséquence d'une teneur plus élevée en DCO_{tot} des lisiers bruts de l'élevage 4 en 2006 et 2008 par rapport aux autres lisiers (Annexes 1 à 3). Ou encore d'un temps de stockage plus faible du lisier brut entre les bâtiments d'élevage et la centrifugeuse sur cette filière (non vérifié). Nous n'avons pas d'hypothèse pour expliquer la faible concentration en AGV dans le refus liquide après centrifugation sinon que la mesure n'a pu être réalisée qu'une fois.

Conclusions

Dans l'ensemble ces résultats restent dans les limites de ceux observés par Loyon *et al.* (2003) lors de la réalisation de leur typologie des élevages porcins dans le cadre du projet "Bilan environnemental des procédés de traitement biologique des lisiers de porcs" financé par l'ADEME (contrat n° 02 75 041).

En l'absence de traitement aérobie, on observe une dégradation partielle de la matière organique des lisiers pendant le stockage qui conduit à une présence importante d'ammonium (2 à 3 g N/L) et d'AGV (3 à 9 g AGV_{tot}/L) dans les lisiers stockés. En présence d'un traitement aérobie, l'azote ammoniacal et les AGV sont dégradés au niveau du traitement biologique et les boues stockées destinées à l'épandage contiennent une teneur réduite en NTK (~ 2 g N/L), ammonium (0,3 g N/L) et DCO soluble (2 à 3 gO₂/L). L'eau des lagunes utilisée en irrigation contient des teneurs basses en azote (< 0,01 g N-N₄⁺/L) et matière organique (~ 1 g O₂ DCO soluble/L). Elle présente un pH basique autour de 9.

3.2. Analyses bactériologiques

3.2.1. Analyse des entrées et sorties des filières

Les analyses bactériologiques réalisées sur les effluents de 17 exploitations porcines mettent en évidence une forte variabilité des concentrations en germes indicateurs d'un élevage à l'autre dans les lisiers bruts et dans les boues destinées à l'épandage (figures 6 et 7). Ainsi, les lisiers bruts contiennent 2×10^2 à $1,4 \times 10^5$ *E. coli*, $1,8 \times 10^3$ à $4,5 \times 10^5$ entérocoques et de $4,8 \times 10^1$ à $7,2 \times 10^4$ spores de *C. perfringens* g⁻¹ MB (matière brute). Il est important de souligner que cette variabilité est indépendante de la durée de stockage du lisier puisque les concentrations en germes indicateurs ne diffèrent pas significativement entre les lisiers stockés moins de 30 jours (types 1 à 4) et ceux correspondant à une durée de stockage supérieure à 6 mois (type 0).

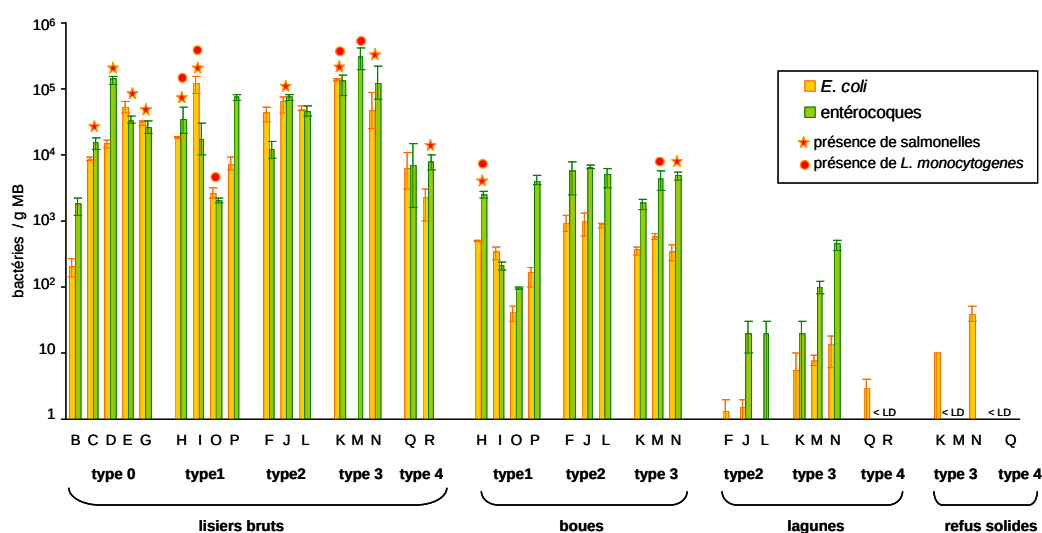


Figure 6 : concentrations moyennes (exprimées par g de matière brute) en *E. coli* et en entérocoques et présence de salmonelles et de *L. monocytogenes* dans les lisiers et les sous-produits issus du traitement de 17 élevages porcins. (Les barres indiquent les valeurs minimales et maximales observées). LD : limite de détection de méthode

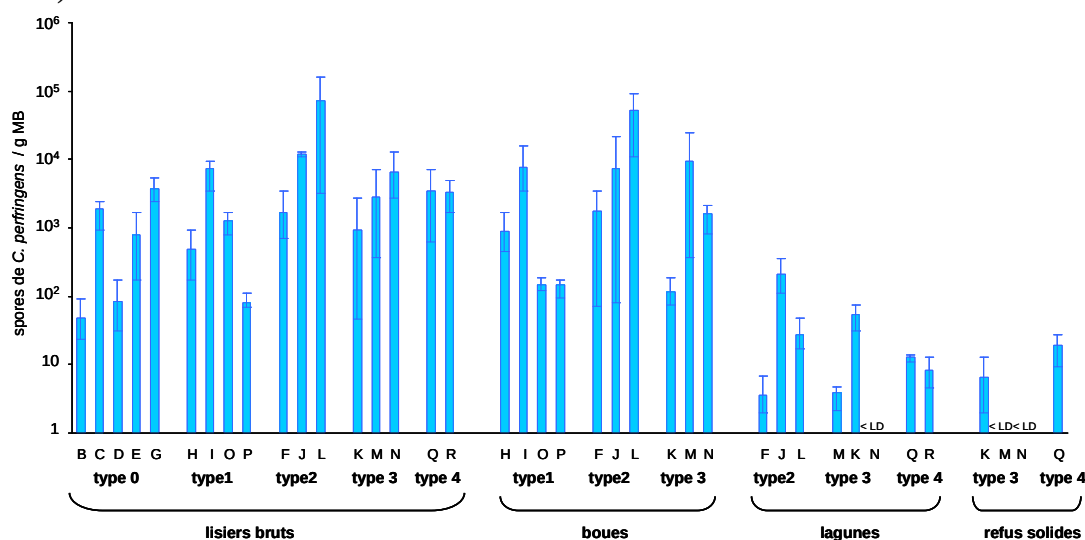


Figure 7 : concentrations moyennes (exprimées par g de matière brute) en spores de *C. perfringens* dans les lisiers et les sous-produits issus du traitement de 17 élevages porcins. (Les barres indiquent les valeurs minimales et maximales observées). LD : limite de détection de méthode

Les concentrations observées dans les boues qui fluctuent de $4,2 \times 10^1$ à 1×10^3 *E. coli* g⁻¹MB et de $9,7 \times 10^1$ à $6,4 \times 10^3$ entérocoques g⁻¹MB sont significativement plus faibles ($p < 0,05$) que celles des lisiers. Toutefois, le traitement du lisier qui associe une digestion aérobie et un stockage des boues de plusieurs semaines n'entraîne qu'un faible abattement ($< 2 \log_{10}$) des deux germes (tableau 16). L'abattement est par ailleurs inexistant pour les spores de *C. perfringens*. Les refus de centrifugation stockés plusieurs semaines et les lagunes représentent les sous-produits les moins contaminés de la filière de traitement avec des concentrations en germes indicateurs inférieures à 5×10^2 bactéries g⁻¹ MB.

Tableau 16 effet des traitements sur les 3 germes indicateurs

Matrices comparées	abattement moyens (en log ₁₀)		
	<i>E. coli</i>	entérocoques	spores de <i>C. perfringens</i>
lisier brut ^a / boues ^b (types 1 à 4)	1,95	1,3	< 0,1
boues ^b / eau de lagune (types 2 et 3)	2,1	1,5	2,3
lisier brut ^a / refus solide ^c (types 3 et 4)	> 3,1	>3,8	>2,7
lisier brut ^a / eau de lagune (types 2 à 4)	>4,4	>4,6	>3,4

^a lisier stocké dans une pré-fosse en sortie du bâtiment ; ^b boues issues de la digestion biologique et stockées en fosse avant épandage; ^c refus stockés en tas plusieurs semaines

Il existe une corrélation significative ($p < 0.01$) entre les concentrations en *E. coli* et en entérocoques lorsque l'on considère l'ensemble des analyses réalisées sur les lisiers et leurs sous-produits alors que les concentrations en spores de *C. perfringens* sont indépendantes de celles des deux autres indicateurs (figure 8). Il convient de souligner que les entérocoques même s'ils présentent globalement le même comportement que *E. coli* sont plus résistants que ces derniers au traitement biologique (tableau 16).

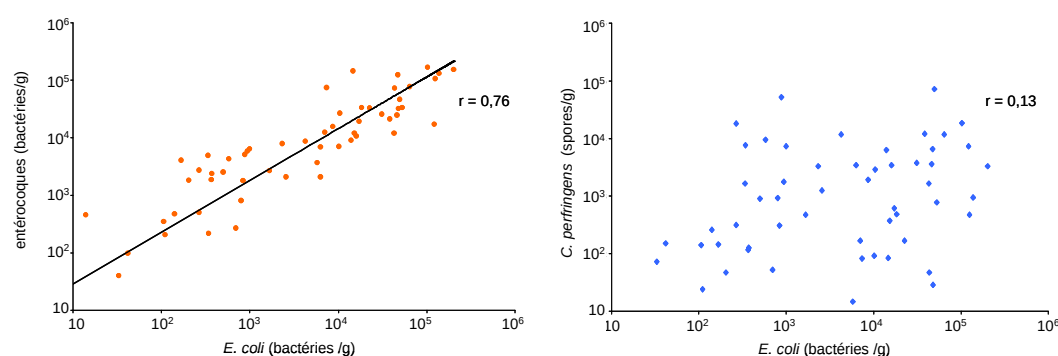


Figure 8 : concentrations en entérocoques et en spores de *C. perfringens* en fonction des concentrations en *E. coli* dans les lisiers et leurs sous-produits (données correspondant à 64 valeurs moyennes)

Les deux germes pathogènes analysés dans cette étude, *Salmonella* et *L. monocytogenes*, ont été retrouvés dans le lisier brut et dans une moindre mesure dans les boues, mais n'ont pas été détectés dans les lagunes et les refus de séparation (Tableau 17). *Salmonella* a été détectée dans 59% des lisiers bruts à des concentrations ne dépassant pas 3 bactéries g⁻¹ MB et dans 20% des boues épandues. *L.*

monocytogenes a été mise en évidence dans 29% des lisiers bruts et a également été retrouvée dans 20% des boues. Comme le montre la figure 2, la présence des deux germes pathogènes est indépendante du type d'élevage. Par ailleurs, il n'existe pas de corrélation entre la présence de *L. monocytogenes* et celle des salmonelles.

Tableau 17: concentrations en *Salmonella* (g^{-1} MB) et prévalence de *L. monocytogenes* dans les lisiers bruts et les sous-produits de 17 élevages.

traitement	matrice	nb éch. ^a	<i>Salmonella</i> /g MB moyenne (EC) ^b	Fréquence de détection en %	
				<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
stockage en fosse (type 0)	lisier brut	5	2,8 (5,5)	80	0
stockage en fosse (types 1 à 4)	lisier brut	12	0,3 (0,35)	50	42
digestion aérobie et stockage	boues	10	0,03 (0,004)	20	20
décantation	eaux de lagunes	8	-	0	0
centrifugation	refus solide	4	-	0	0

^a nombre d'échantillons; ^b écart type

Les souches de *Salmonella* présentes dans les 10 élevages correspondent à 6 sérotypes essentiellement représentés par *Salmonella* Derby et *S. Anatum* retrouvés respectivement dans 4 et 2 lisiers. Les 4 autres sérotypes identifiés chacun dans un lisier correspondent à *S. Typhimurium*, *S. Bovis-morbificans*, *S. Hadar* et *S. Infantis*. Les sérotypes des souches de *Salmonella* isolées des lisiers correspondent majoritairement à *Salmonella* Derby (retrouvé dans 40% des lisiers analysés). Quatre autres sérotypes (*Infantis*, *Hadar*, *Anatum* et *Typhimurium*) ont été mis en évidence mais avec une fréquence ne dépassant pas 10%. Quatre sérotypes de *L. monocytogenes* ont été identifiés: 1/2a, 1/2b, 4a et 4b.

3.2.2. Conclusions.

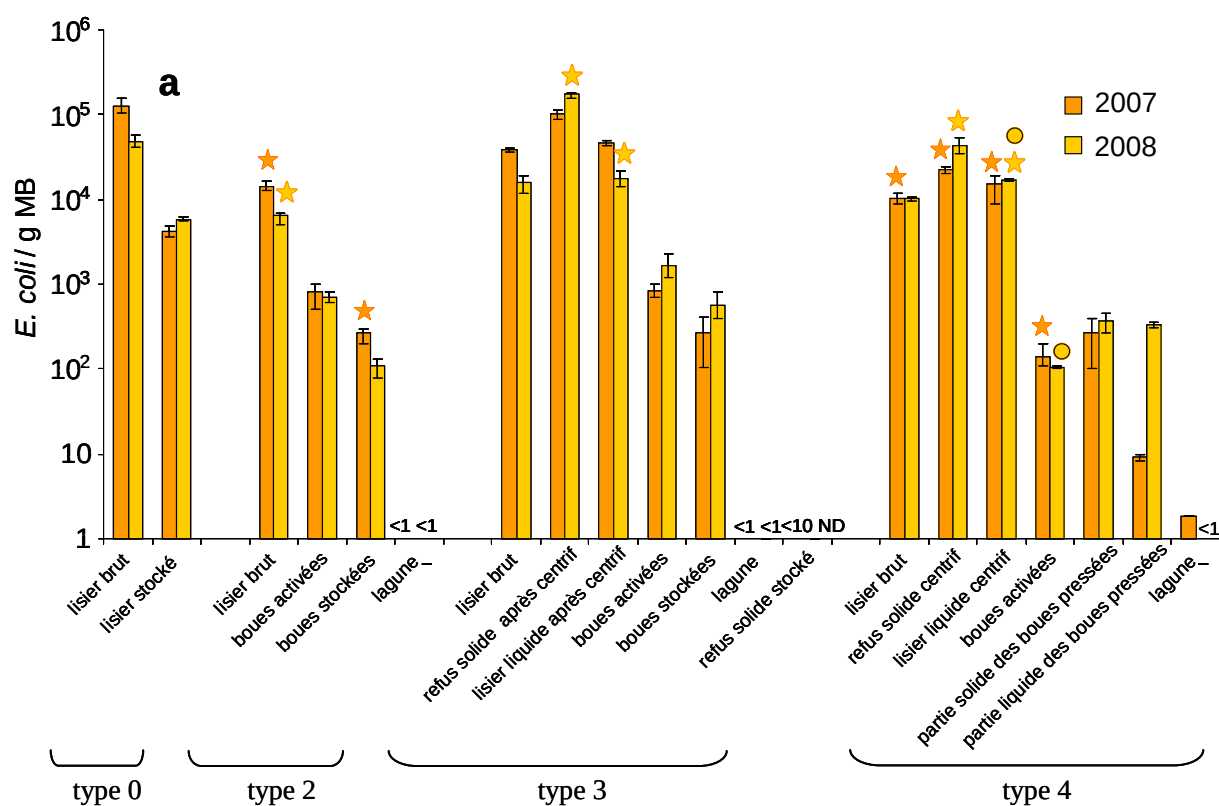
L'étude réalisée sur les effluents de 17 élevages bretons met donc en évidence 5 résultats majeurs :

- une variabilité des concentrations en germes indicateurs dans les lisiers bruts de 2×10^2 à $1,4 \times 10^5$ *E. coli*, $1,8 \times 10^3$ à $4,5 \times 10^5$ entérocoques et de $4,8 \times 10^1$ à $7,2 \times 10^4$ spores de *C. perfringens* par gramme de matière brute, indépendante de la durée de stockage (allant de 1 à 6 mois) ;
- une différence de survie des trois germes indicateurs au cours des traitements, les spores de *C. perfringens* étant particulièrement résistantes ;
- la présence de *Salmonella* et de *L. monocytogenes* dans les lisiers bruts, les lisiers stockés et dans une moindre mesure dans les boues destinés à l'épandage, mais pas dans les lagunes et les refus de centrifugation ;
- un faible impact du traitement biologique (1 à $2 \log_{10}$) sur l'ensemble des germes étudiés.
- un impact plus fort du lagunage et du stockage des refus de centrifugation conduisant à une contamination faible ou inexistante des eaux de lagunes et des refus de centrifugation

3.2.3. Suivi des germes le long des filières

Afin d'estimer plus précisément l'impact de chaque étape du traitement sur le comportement des germes, deux autres campagnes de prélèvements ont été menées en 2007 et 2008 sur 4 élevages représentatifs des filières. Les concentrations en germes ont été mesurées sur le lisier brut ainsi que dans les sous-produits liquides et solides issus du traitement : fractions solides ou liquides du lisier centrifugé, boues activées du bassin d'aération, boues stockées en silo, fractions solides ou liquides des boues obtenues après pressage mécanique, eau de lagune. L'évolution des concentrations en germes indicateurs obtenues après chaque étape du traitement est présentée sur les figures 9 et 10.

Que ce soit dans les lisiers bruts ou dans les effluents traités, les concentrations en germes indicateurs présentent des variations qui sont nettement plus marquées entre les 4 élevages (avec des écarts pouvant atteindre $2 \log_{10}$) que d'une année à l'autre au sein d'un même élevage. Ainsi, les concentrations en *E. coli* et en entérocoques dans les lisiers bruts des 4 élevages sont comprises entre 9×10^3 et $1,5 \times 10^5$ en 2007 et entre 2×10^3 et 6×10^4 germes/g en 2008 alors que les différences de concentrations entre les deux années pour chaque élevage sont inférieures à $0,6 \log_{10}$, excepté pour le liquide issu de la presse (type 4). Par ailleurs, les deux germes présentent un comportement similaire tout au long des filières de traitement. Les concentrations en *C. perfringens* présentent de fortes variations qui ne peuvent être associées ni au type de traitement, ni à la date de prélèvement (figure 10).



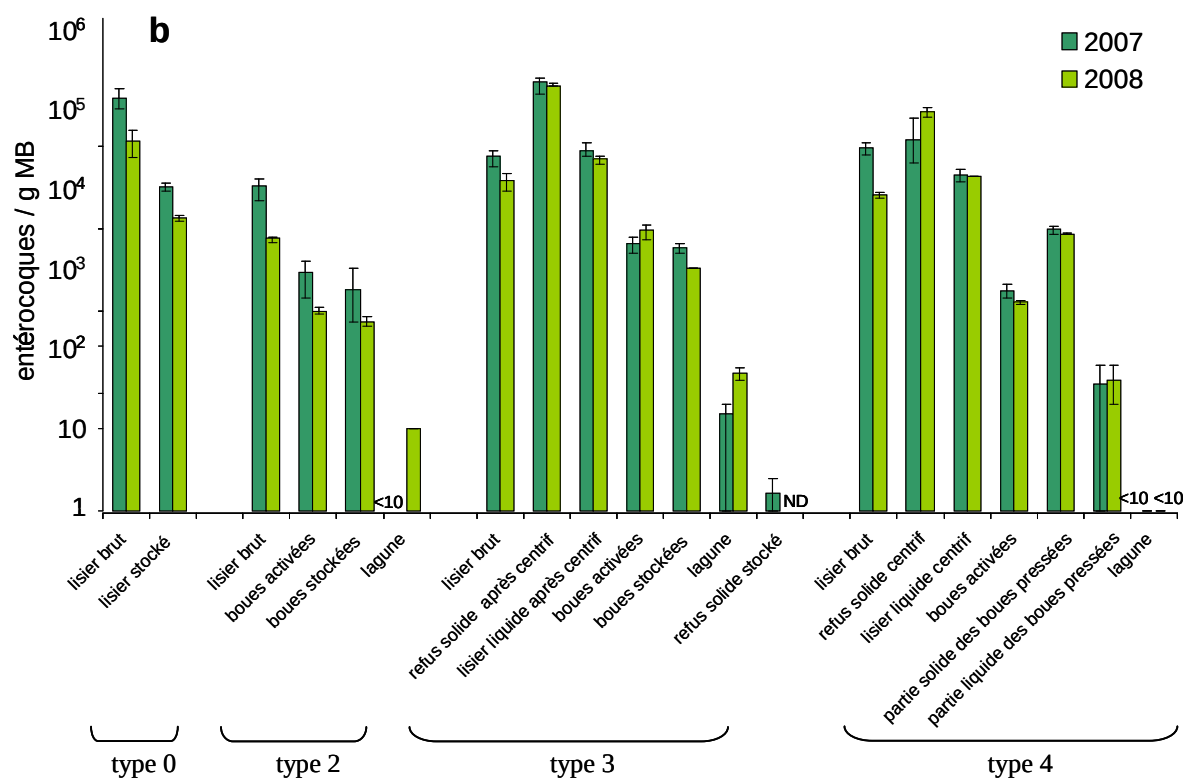


Figure 9 : Concentrations moyennes en *E. coli* (a) et en entérocoques (b) observées en 2007 et 2008 dans le lisier brut et dans les sous-produits issus du traitement de 4 types d'élevages. La présence de salmonelles est représentée par une étoile et celle de *L. monocytogenes* par un cercle. Les barres indiquent les valeurs minimales et maximales. ND correspond à un échantillon non analysé

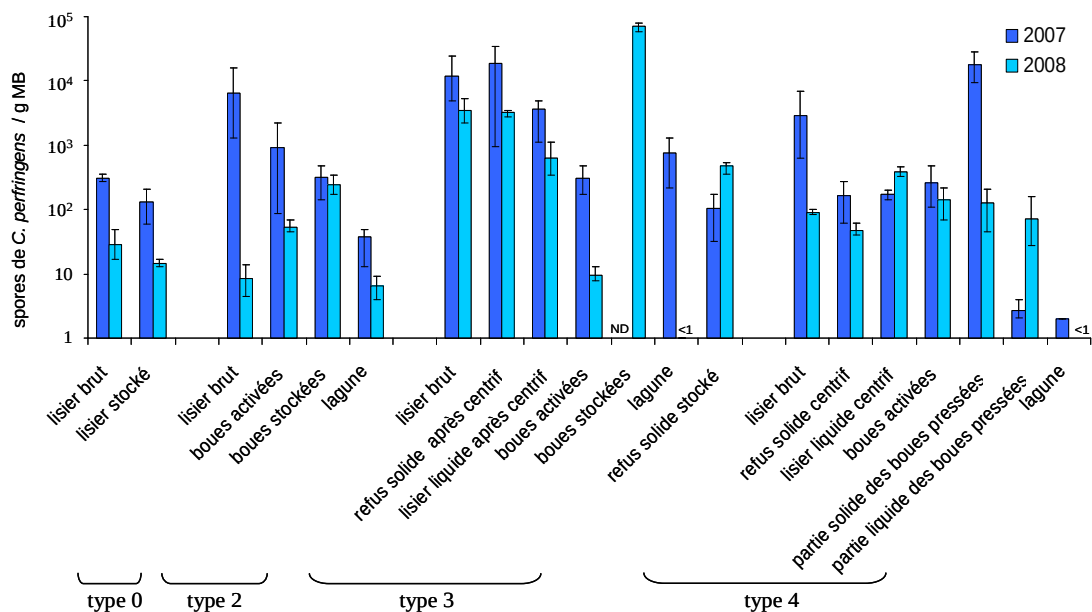


Figure 10 : Concentrations moyennes en spores de *C. perfringens* observées en 2007 et 2008 dans le lisier brut et les sous-produits issus du traitement de 4 types d'élevages. Les barres indiquent les valeurs minimales et maximales. ND correspond à un échantillon non analysé.

Malgré l'apport continu de lisier frais dans la fosse, le simple stockage pendant 6 à 9 mois du lisier, diminue la concentration en germes indicateurs d'une unité logarithmique (tableau 18). La séparation mécanique du lisier brut entraîne une augmentation du nombre de *E. coli* et d'entérocoques dans la fraction solide mais n'a aucun effet significatif sur leur nombre dans la fraction liquide. Le refus de centrifugation destiné à être stocké en tas puis exporté, présente donc un risque sanitaire au moins équivalent à celui du lisier brut. Le traitement biologique, avec un abattement compris entre 1 et 2 unités logarithmiques, représente l'étape du traitement dont l'effet sur les germes indicateurs est le plus marqué. Les boues activées peuvent être soit décantées dans un bassin de stockage (filière de type 3), soit être pressées et mélangées au refus de centrifugation (filière de type 4). Le stockage des boues conduit à une diminution de l'ordre de 0,5 unités logarithmiques des concentrations en indicateurs alors que le pressage concentre les germes dans la fraction solide.

Il est intéressant de noter que les deux systèmes de séparation mécanique (la centrifugation du lisier et le pressage des boues sur filtre) ont un impact similaire qui se traduit par une augmentation du nombre de germes dans les phases solides. Cette concentration est corrélée au taux de matière sèche qui passe de 3% dans le lisier brut à 35% dans les refus de centrifugation et à 16% et dans les boues pressées.

Les eaux de lagunes et les refus de centrifugation stockés plusieurs semaines sont nettement moins contaminés que les boues. Les germes indicateurs, lorsqu'ils sont détectés présentent des teneurs inférieures à 50 germes par gramme.

Tableau 18 : comparaison des abattements des trois germes indicateurs pour les deux années d'étude

code élevage			Abattement exprimé en unité logarithmique					
	matrice initiale	matrice finale	<i>E. coli</i>		entérocoques		<i>C. perfringens</i>	
			2007	2008	2007	2008	2007	2008
type 0	lisier brut	lisier stocké en fosse	1,5	0,9	1,1	0,9	0,4	0,3
type2	lisier brut	boues activées	1,2	1,0	1,1	0,9	0,8	-0,8
	boues activées	boues stockées en fosse	0,5	0,8	0,2	0,1	0,5	-0,6
	lisier brut	boues stockées en fosse	1,7	1,8	1,3	1,0	1,3	-1,5
type 3	lisier brut	solide sortie centri ^b	-0,4	-1,1	-0,9	-1,2	-0,2	0,03
	lisier brut	liquide sortie centri	-0,08	-0,03	-0,06	-0,3	0,5	0,8
	liquide sortie centri ^a	boues activées	1,7	1,0	1,1	0,9	1,0	1,8
	boues activées	boues stockées en fosse	0,5	0,5	0,05	0,5	nd	-3,9
	lisier brut	boues stockées en fosse	2,2	1,5	1,1	1,1	nd	-1,3
type 4	lisier brut	solide sortie centri	-0,3	-0,6	-0,09	-1,0	1,2	0,3
	lisier brut	liquide sortie centri	-0,2	-0,2	0,3	-0,2	1,2	-0,6
	liquide sortie centri	boues activées	2,0	2,2	1,4	1,5	-0,2	0,4
	boues activées	boues sortie de presse	-0,3	-0,5	-0,8	-0,8	-1,9	0,05
	boues activées	liquide sortie de presse	1,2	-0,5	1,1	1,0	2,0	0,3
	lisier brut	boues sortie de presse	1,6	1,4	1,0	0,5	-0,8	-0,15

^a effluent liquide issu de la centrifugation du lisier brut, ^b résidu solide issu de la centrifugation du lisier brut

Les concentrations en *C. perfringens* présentent des fluctuations importantes y compris au sein même des analyses réalisées en triplicats comme le montrent les valeurs minimales et maximales reportées sur la figure 6, ce qui rend difficile toute interprétation des données. Cette variabilité peut être attribuée, d'une part au manque de précision de la méthode NPP 5 tubes employée pour la recherche de ce germe, et d'autre part à la difficulté d'obtenir une germination systématique et reproductible des spores après le choc thermique. Enfin; le caractère ubiquiste de *C. perfringens* et sa capacité de résistance dans l'environnement contribuent également à la disparité des résultats.

L'étude a été complétée par la recherche de *Listeria monocytogenes* et le dénombrement de *Salmonella*. La présence de *L. monocytogenes* n'a été détectée que dans deux prélèvements correspondant aux boues activées et aux boues pressées de l'élevage de type 4. *Salmonella* a été mise en évidence dans trois des quatre élevages (types 2, 3 et 4) à des concentrations faibles (tableau 19).

Tableau 19 : valeurs maximales en salmonelles dans les lisiers et les sous-produits des élevages de types 2, 3 et 4

matrice	concentrations maximales en salmonelles / 10g					
	Type 2		Type 3		Type 4	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008
lisier brut	0,4	0,4	-	-	2,9	-
liquide sortie centri ^a	- ^c	-	-	0,9	1	0,4
solide sortie centri ^b	-	-	-	1	0,7	0,4
boues activées	0,4	-	-	-	0,4	-

^a effluent liquide issu de la centrifugation du lisier brut, ^b résidu solide issu de la centrifugation du lisier brut

^c non détectée (< 0,4 dans 10 g)

Les 2 élevages dont les effluents étaient contaminés par des salmonelles en 2007 l'étaient encore en 2008 ce qui indique une présence endémique de ce germe pathogène. Toutefois, en raison des faibles concentrations observées dans les lisiers, proches du seuil de détection de la méthode, il est possible de sous-estimer la présence des salmonelles. Ainsi, des salmonelles ont été détectées dans le lisier brut et le refus de centrifugation de l'élevage de type 3 au cours d'autres campagnes de prélèvement réalisées en 2006 et 2007.

3.2.4. Conclusions.

Les faibles variations des germes d'une année à l'autre, indépendamment de la localisation du prélèvement au sein des filières, traduit une stabilité des concentrations bactériennes. Celle-ci peut être due au mode de gestion des effluents d'élevage : apport régulier de lisier frais et temps de séjour constant dans les différents ouvrages. Les filières de traitement entraînent un abattement global des germes indicateurs de 1 à 2 unités logarithmiques, l'inhibition la plus forte étant obtenue lors du séjour du lisier, qu'il soit centrifugé ou non, dans le bassin d'aération. Les faibles teneurs en salmonelles, de l'ordre de la limite de détection de la méthode, peuvent expliquer que ces germes ne soient pas détectés systématiquement d'une année à l'autre.

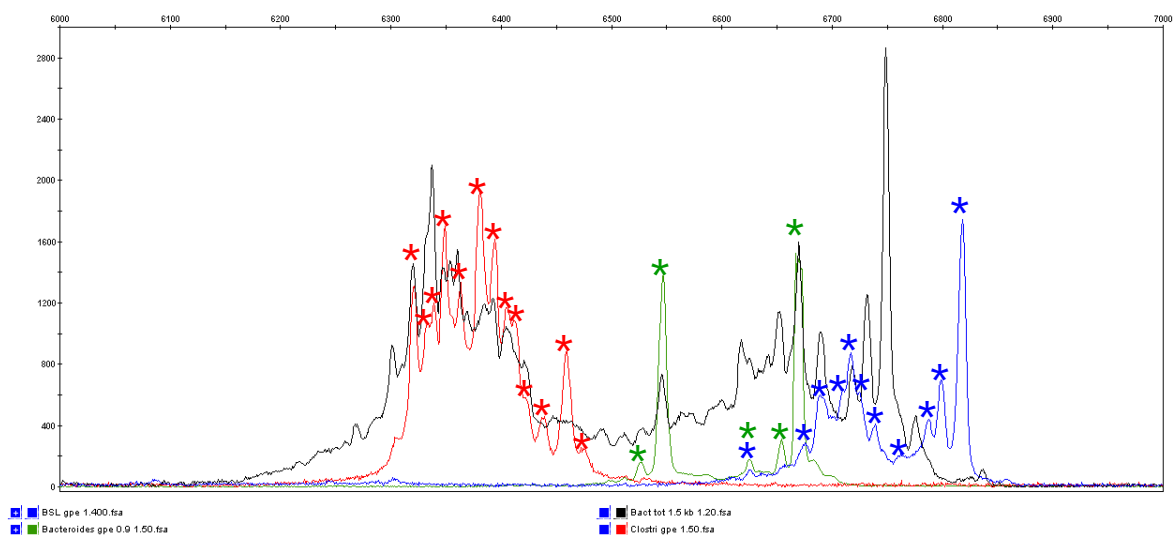


Figure 11 : Profils SSCP de l'échantillon de lisier brut de l'élevage H, pour les différents groupes microbiens recherchés. Bactéries totales (noir), *Clostridium* (rouge), *Bacteroides* (vert) et bactéries lactiques (bleu). Abscisse : temps, l'électrophorèse s'effectue de la droite vers la gauche. Ordonnée : niveau de fluorescence.

3.3. Résultats des analyses moléculaires.

3.3.1. Suivi des communautés microbiennes par CE-SSCP ciblant l'ADNr 16S

Les communautés microbiennes des 62 prélèvements ont été analysées par amplification PCR de la région V3 des ADNr 16S microbiens et électrophorèse capillaire SSCP des produits de PCR obtenus. Pour chacun d'eux, quatre groupes microbiens ont été recherchés (Bactéries totales, *Clostridium-Eubacterium*, *Bacteroides-Prevotella* et Bactéries lactiques (*Bacillus-Streptococcus-Lactobacillus*), soit un total de 248 profils SSCP effectués. Ces groupes microbiens ont été choisis car ils représentent 80% des espèces détectées dans les flores fécales porcines et dans les lisiers de porcs par des techniques moléculaires (Peu *et al.*, 2006). Les profils SSCP ont été alignés entre eux afin :

- i) de comparer les profils des communautés microbiennes d'un même type d'échantillon ;
- ii) d'observer la persistance des pics dominants rencontrés dans les lisiers bruts au travers des filières de traitement.

Seuls les profils correspondant aux bactéries totales sont présentés dans ce rapport. Les profils de groupes ont en effet conduit globalement aux mêmes conclusions.

3.3.1a. Méthode d'analyse des profils SSCP et développement du logiciel Safus.

Le graphique de la figure 11 montre, par exemple, les profils SSCP obtenus pour le lisier brut de l'échantillon H. Cette technique permet de visualiser les communautés microbiennes sous la forme de profils de pics où chaque pic clairement distinguable correspond à une population microbienne dominante de la communauté. La comparaison des profils permet d'estimer la diversité microbienne de l'échantillon et de rechercher la présence de populations communes aux différents prélèvements (pics qui co-migrent). La technique étant semi quantitative, les comparaisons portent sur la présence et la proportion relative des pics dans les profils.

Pour le lisier brut de l'élevage H (figure 11), le profil des bactéries totales (en noir) est caractérisé par une zone centrale de pics de faible intensité encadrée par 2 groupes de migration de pics plus importants. Une trentaine de pics peut être distinguée au dessus d'un fort bruit de fond, ce qui correspond à la limite de résolution de la technique (Loisel *et al.*, 2006). Ce profil est typique de ceux qui ont été obtenus lors de cette étude et précédemment au laboratoire. Il résulte de la grande diversité des espèces présentes dans le lisier. Les profils des groupes sont plus lisibles, 13 pics sont visibles sur le profil des *Clostridium* (en rouge), 5 sur le profil des *Bacteroides* (en vert) et 11 sur le profil des bactéries lactiques (en bleu). L'alignement de tous les profils permet de co-localiser les zones de migration et les pics dominants des profils des groupes avec le profil des bactéries totales.

La comparaison et la représentation d'un grand nombre de profils (supérieur à 20) ne sont cependant pas réalisables avec le logiciel standard des analyseurs génétiques. Nous avons donc utilisé et adapté un logiciel d'analyse statistique des profils SSCP développé au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne (Logiciel Safum, Zemb *et al.*, 2007). Ce logiciel permet d'aligner les profils par rapport à une référence unique, d'exporter les données des

profils sous Excell pour faciliter leur présentation, de quantifier la surface des pics détectés, et surtout, de comparer les profils entre eux selon la méthode statistique d'ACP (analyse en composante principale). La version originale étant développée sous le logiciel commercial Matlab, nous l'avons traduite et optimisée pour fonctionner sous le logiciel libre Scilab. Cette nouvelle version s'appelle Safus et est disponible sur le site internet du Cemagref de Rennes.

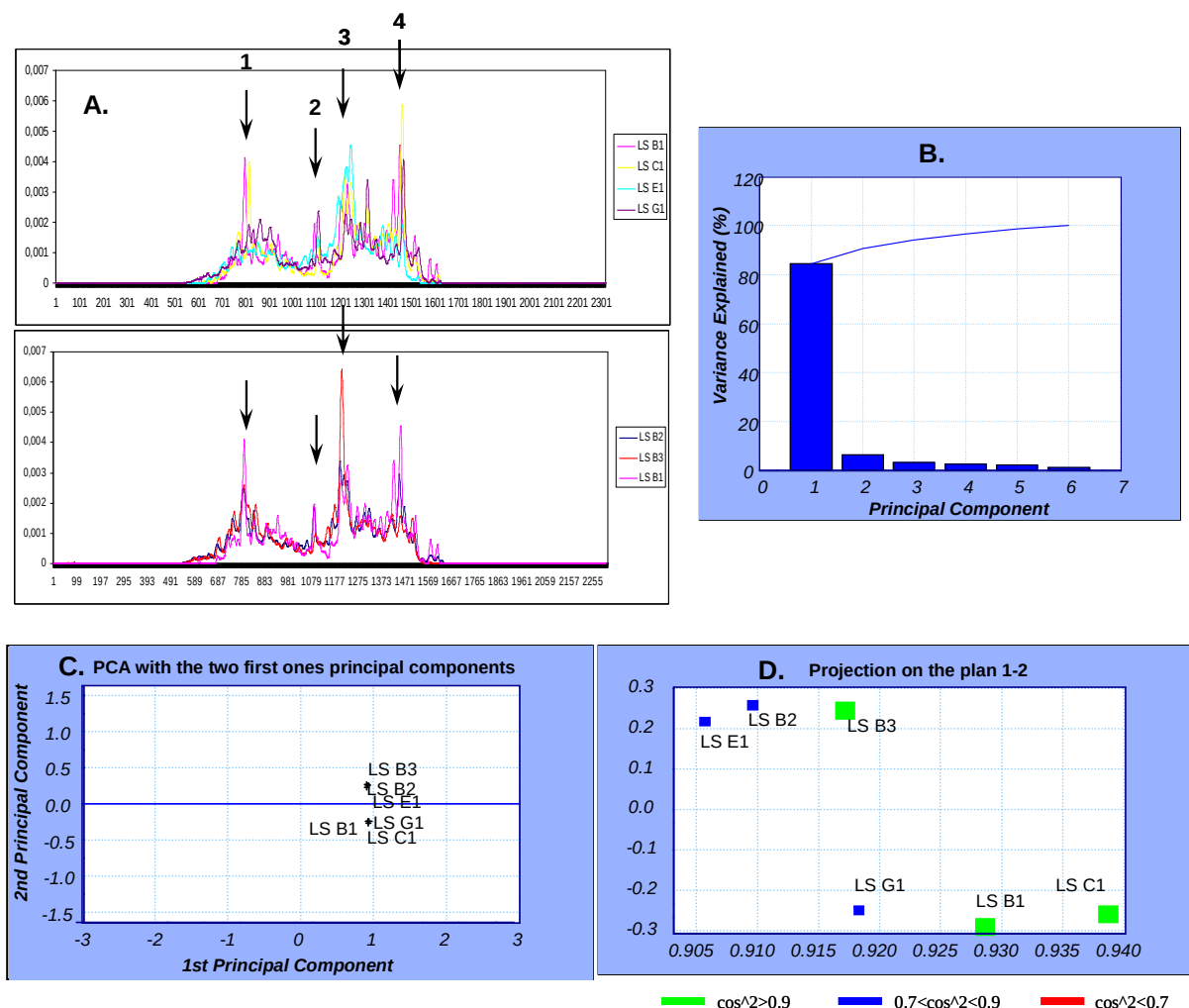


Figure 12 : Comparaison des profils SSCP par ACP

En A. Alignement des profils SSCP des bactéries totales obtenus à partir des lisiers stockés des élevages B, C, E, et G.

En B., C. et D., résultats de la comparaison des profils par ACP à l'aide du logiciel Safus.

Pour cette figure et toutes les figures suivantes, les prélèvements sont repérés par leur nature (LS) puis par l'élevage (B, C, E, etc) et l'année (1, 2 et 3 correspondent à 2006, 2007 et 2008, respectivement).

La figure 12 présente les résultats obtenus à l'aide de l'outil Safus. En A., nous avons un alignement des profils SSCP bactériens des lisiers stockés (LS) prélevés la première année du projet (2006) pour les élevages B, C, E et G, puis un alignement des trois lisiers de l'élevage B prélevés en 2006, 2007 et 2008 (profils LSB1, B2 et B3 respectivement). Bien que l'observation visuelle nous permette d'apprécier le degré de ressemblance entre les profils, elle ne nous permet pas de les classer entre eux selon ce critère.

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode mathématique d'analyse des données qui consiste à rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre n variables aléatoires. L'ACP va donc comparer les coordonnées (abscisses et ordonnées) de chacun des points de chaque profil SSCP et regrouper entre eux les profils les plus ressemblants. Elle va rechercher le nombre de composantes minimum qui permet d'expliquer le mieux les différences entre les profils et proposer une représentation graphique des résultats. Ainsi, les informations fournies par l'ACP sont de trois ordres :

- en B., le % de variance expliquée par chaque composante. Ici, la première composante permet d'expliquer plus de 80% de la variabilité observée et la somme des deux premières composantes explique jusqu'à 90% de la variabilité
- en C., les corrélations dans l'espace des 6 profils SSCP analysés sont visualisées dans un plan généré par les 2 composantes principales de l'analyse. On constate que les 6 profils se regroupent dans le plan, ils sont donc très similaires.
- Enfin, la figure D. montre la confiance à accorder à la projection des profils dans le plan de la figure C. Les points notés en vert sont statistiquement très bons, les points en bleu sont acceptables, les points en rouge sont mal représentés et n'appartiennent pas au plan (il n'y en a pas dans cet exemple).

En revanche, dans le cas des profils SSCP, l'ACP ne donne pas d'information sur la nature des composantes qui permettent de différencier les profils entre eux. C'est donc par la connaissance des prélèvements correspondants et l'interprétation des résultats que nous allons pouvoir proposer des conclusions. Ainsi, figure 12, nous constatons que pour l'élevage B, il y a une différence entre le profil de l'année 2006 (LSB1, qui est proche de LSC1 et LSG1) et ceux des années 2007 et 2008 (LSB2 et B3 sont plus proches de LSE1). Cette représentation suggère donc qu'il y a une différence de communauté microbienne du lisier stocké plus importante entre 2006 et 2007 que (1) entre 2007 et 2008 et (2) pour l'année 2006, entre celle de l'élevage E (LSE1) et celles des élevages B, C et G.

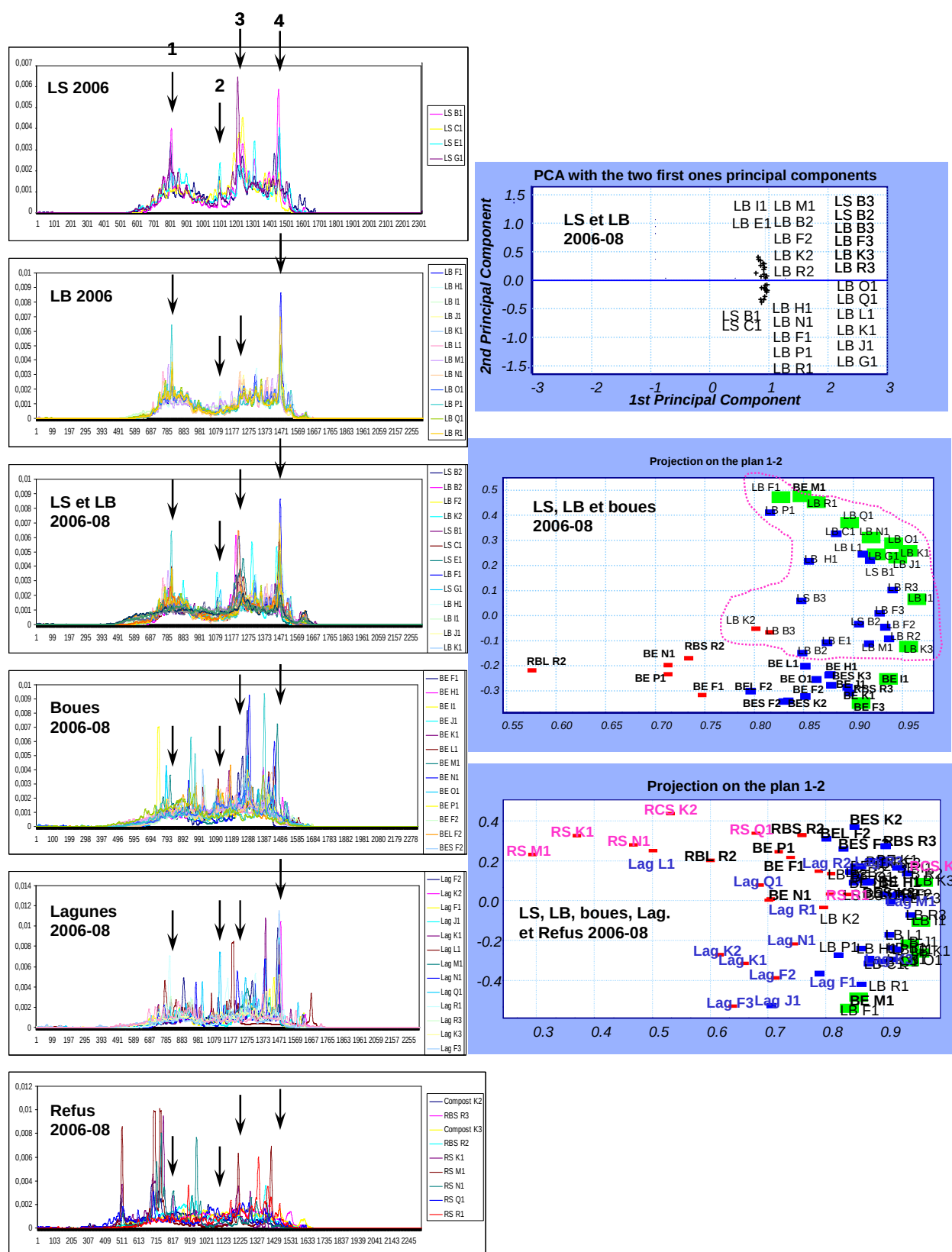


Figure 13 : Alignement des profils SSCP des Bactéries totales obtenus pour tous les échantillons et résultats des ACP correspondantes. Les flèches verticales indiquent les 4 pics dominants dans la majorité des lisiers bruts et leur position supposée dans les autres échantillons.

3.3.1b. Comparaison des profils SSCP obtenus dans un même type d'ouvrage

L'alignement de l'ensemble des profils SSCP des Bactéries totales est présenté sur la figure 13. Les profils obtenus pour les lisiers stockés (6 mois et plus) en 2006 présentent une grande similarité, avec toujours les trois zones décrites précédemment au dessus desquelles émergent quatre groupes de pics majoritaires notés 1, 2, 3 et 4 (LS 2006). Ces profils sont relativement comparables avec ceux obtenus la même année pour les lisiers bruts qui pourtant n'ont pas été stockés plus de 1 mois (LB 2006). Il semblerait donc que les communautés microbiennes des lisiers évoluent peu pendant le simple stockage anaérobie, comme nous l'avions déjà constaté dans *Peu et al.* (2006). Ainsi, les groupes de pics 1 à 4 sont présents dans plus de 80% des profils de lisiers bruts et stockés, suggérant l'existence d'espèces microbiennes systématiquement dominantes dans les lisiers de porcs. L'homogénéité de composition de la flore microbienne des lisiers bruts pourrait s'expliquer par la grande standardisation des races et de l'alimentation des porcs et par la faible évolution de la communauté microbienne du lisier brut pendant le stockage anaérobie.

L'alignement des profils des lisiers bruts et stockés des années 2007 et 2008 avec ceux de 2006 introduit une hétérogénéité dans la figure (LS et LB 2006-08). Cette hétérogénéité suggère un changement de communauté microbienne d'une année à l'autre. L'analyse ACP montre un regroupement de la majorité des profils des lisiers de 2006 entre eux (sauf LBE1, I1 et M1) au dessous de l'horizontale du graphique (figure 13, graphe ACP en haut à droite), tandis que les profils des années 2007-08 restent groupés au dessus. Nous retrouvons donc le même résultat que celui observé précédemment figure 12 avec une différence plus forte entre 2006 et 2007-08 qu'entre les profils issus d'élevages différents.

Les profils SSCP obtenus pour les boues apparaissent différents de ceux obtenus pour les lisiers bruts et stockés (Boues 2006-08). Les trois zones de migration définies précédemment sont nettement moins prononcées et une plus grande diversité de pics est observée dans l'ensemble des profils. Les quatre groupes de pics majoritaires repérés dans les profils de lisier brut ne sont plus systématiquement visibles dans tous les profils. Ces observations suggèrent une évolution de la communauté microbienne du lisier et une modification progressive des groupes bactériens dominants. Cette évolution des profils se traduit dans le graphe de l'ACP par un positionnement des profils de boues à l'extérieur d'une zone regroupant les lisiers bruts et stockés (à l'exception de la boue BE M1) (graphe ACP du milieu à droite figure 13). Nous pouvons donc en conclure que la variabilité introduite par la nature du prélèvement (boue versus lisier) est plus forte que celle introduite par les années ou l'élevage.

Enfin, les lagunes et les refus de centrifugation présentent des profils SSCP encore différents, qui s'éloignent toujours plus des profils observés pour les lisiers bruts. Le graphe ACP (en bas à droite) positionne ces profils de manière très dispersée comparé aux profils précédents et en majorité

en dehors des groupes de lisier et de boues. Il serait presque possible de définir des zones du graphe correspondant aux lagunes et aux refus de centrifugation. Cependant, la majorité de ces profils ne sont pas bien représentés dans le plan analysé puisque leur positionnement apparaît en rouge.

3.3.1c. Conclusions.

Les lisiers bruts et stockés présentent des profils SSCP similaires qui suggèrent une homogénéité des communautés microbiennes dominantes des lisiers et une faible évolution de celles-ci pendant le stockage anaérobie. Ces résultats sont en accord avec *Peu et al.* (2006). Les autres types d'effluent analysés (boues, refus de centrifugation et lagune) présentent des profils SSCP très variables et très distincts des profils obtenus sur les lisiers bruts. Cette grande variabilité a été observée également au niveau des profils des groupes (données montrées dans le rapport d'étape 2007).

Page vierge pour faciliter la lecture

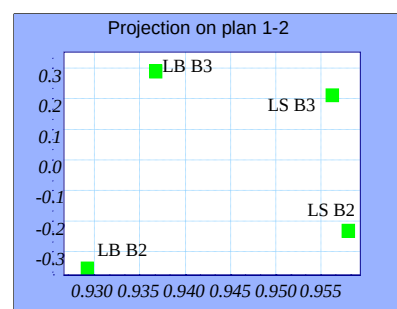
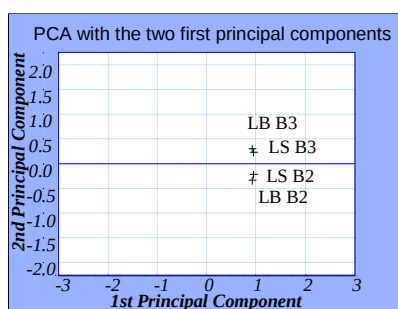
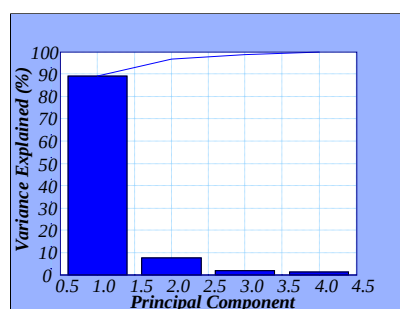
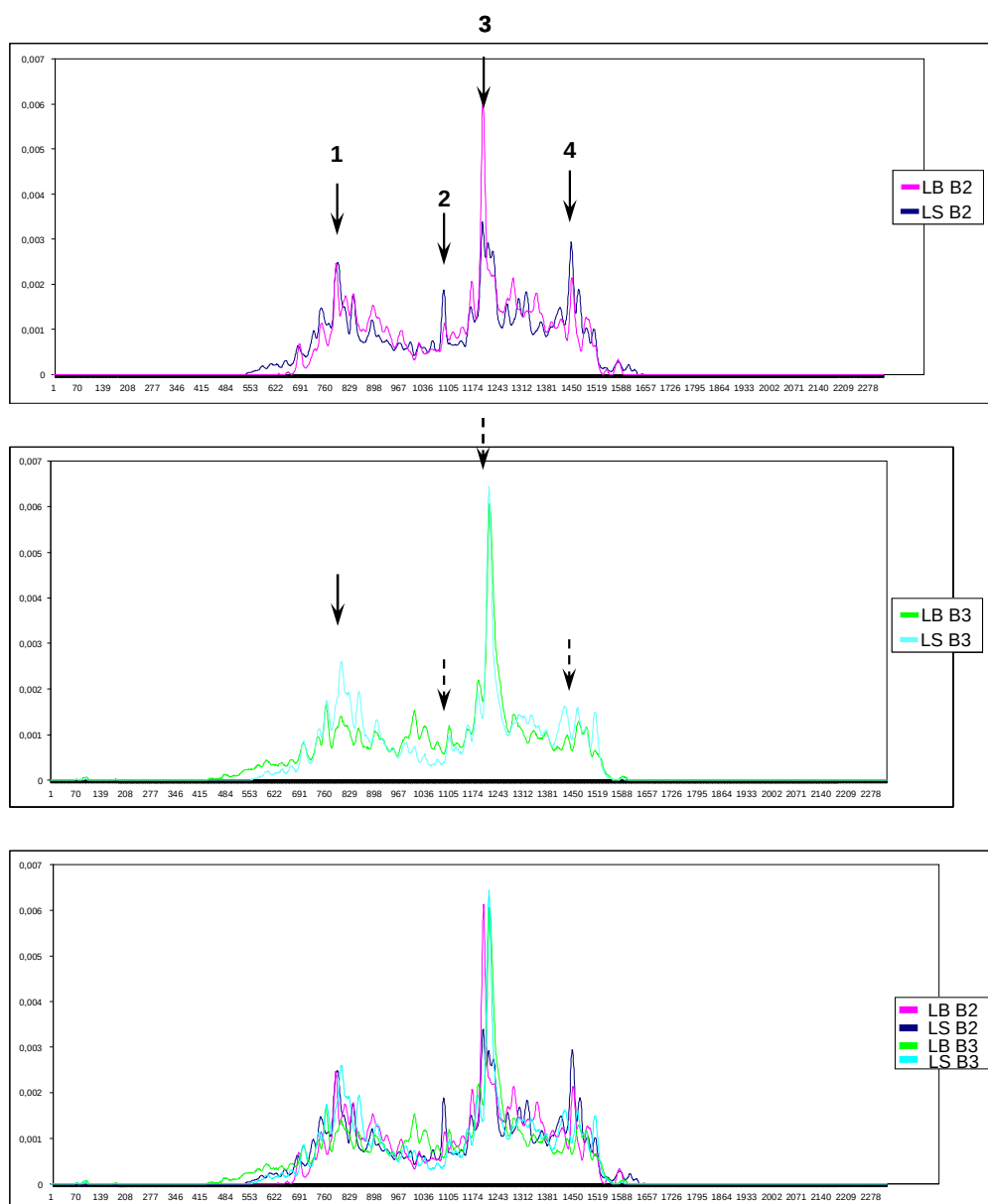


Figure 14 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 0 et résultats de l'analyse ACP. LB, lisier brut ; LS, lisier stocké ; B2, année 2007 ; B3, année 2008. Les flèches verticales indiquent les 4 pics dominants dans la majorité des lisiers bruts et leur position supposée dans ces échantillons. Lorsque les flèches sont pleines, il y a co-migration parfaite des pics et une bonne probabilité pour que les populations microbiennes soient identiques. Lorsque les flèches sont en pointillés, la co-migration n'est pas parfaite et le pic pourrait correspondre à une autre population microbienne.

3.3.1d. Comparaison des profils SSCP obtenus par filière de traitement

Les profils SSCP ont été alignés de manière à visualiser les changements de la communauté microbienne à chaque étape des filières de traitement du lisier.

Filière de type 0. Cette filière consiste dans un simple stockage du lisier brut en fosse anaérobie. L'alignement des profils obtenus pour le lisier brut et le lisier stocké plus de 6 mois souligne la présence de nombreux pics dominants communs aux deux profils pour une même année (Figure 14). Le stockage anaérobie semble donc avoir un impact limité sur la communauté microbienne du lisier. Un nombre important de populations bactériennes, dont les 4 groupes de pics dominants observés en 2006, persiste depuis le lisier brut jusqu'au moment de l'épandage. Les profils observés pour l'année 2008 ont la même forme générale que ceux de l'année 2007 mais ne sont pas rigoureusement identiques, ce qui suggère malgré tout une certaine variabilité d'une année à l'autre.

Cet exemple simple, nous permet aussi de valider notre analyse ACP. En effet, les résultats suggèrent que 95% de la variabilité des profils peuvent être expliqués selon 2 composantes (graphe de gauche). Le graphique des composantes (au milieu) montre que la composante principale qui relie les prélèvements est l'année du prélèvement puisque les profils B2 et B3 sont regroupés entre eux de part et d'autre de l'horizontale. La seconde composante serait la nature du prélèvement puisque les deux lisiers bruts sont plutôt sur la gauche du graphique tandis que les lisiers stockés sont plutôt sur la droite. Enfin, cette représentation des profils dans un même plan est validée par le graphique de confiance qui attribue des points verts aux 4 profils.

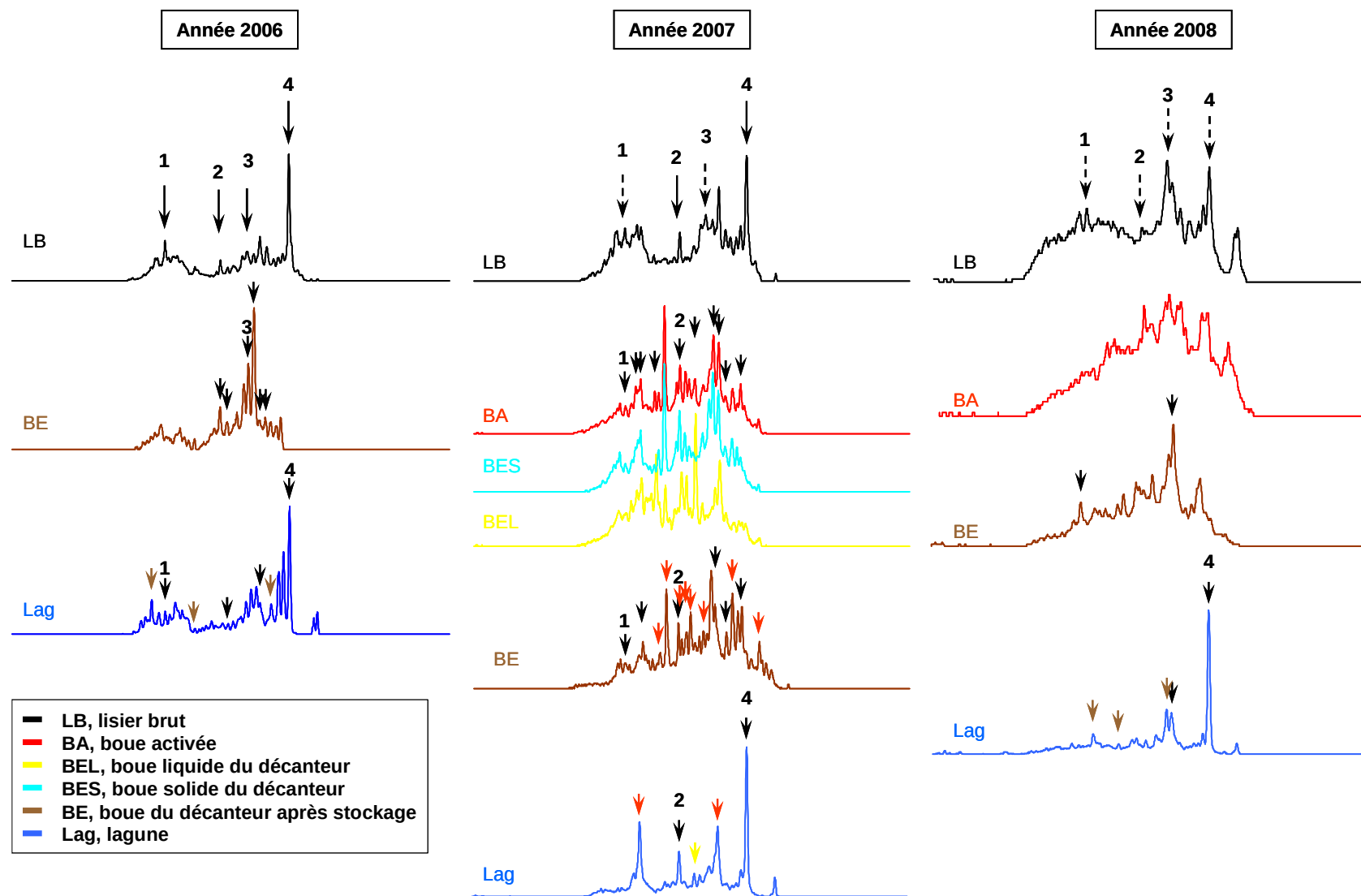
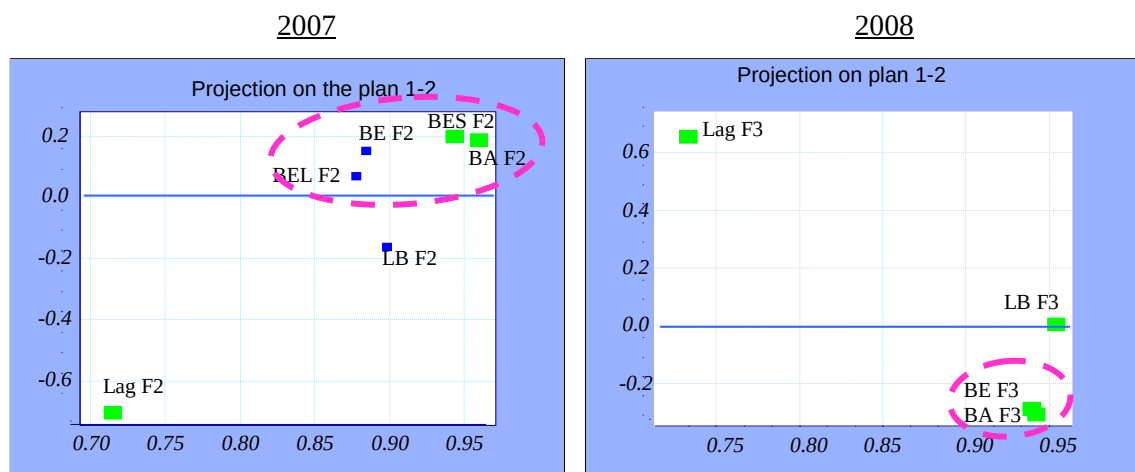


Figure 15 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 2. Les flèches numérotées de 1 à 4 sur les profils LB correspondent aux 4 pics dominants des lisiers bruts observés en 2006. Flèches pleines = co-migration correcte ; flèches pointillées = co-migration possible. Les flèches présentent sur les autres profils indiquent les pics communs entre les profils et qui semblent persister d'une étape à l'autre de la filière (pics noirs pour le LB, pics marrons pour les boues etc.).

La filière de type 2 possède un traitement biologique sans séparation préalable des phases solides et liquides du lisier. L'alignement des profils montre une évolution de leur allure générale qui suggère un changement des communautés microbiennes tout au long de la filière (figure 15). A noter que les profils LB et BA de l'année 2008 sont particulièrement mal résolus, probablement suite à un problème technique lors de l'électrophorèse. Pour les autres, les profils des boues activées sont en apparence assez différents de ceux des lisiers ce qui montre une évolution (et/ou une dilution) de la communauté microbienne du lisier dans la boue activée. Au niveau du décanteur (année 2007), le profil de la boue du décanteur est quasiment identique à celui de la boue activée. Cette observation est logique puisque la boue prélevée dans le décanteur était relativement récente. De même, assez logiquement, le profil du liquide du décanteur présente de fortes similitudes avec celui de la boue excepté pour quelques pics qui pourraient être expliqués par une différence de capacité de certaines bactéries à exister sous forme planctonique ou agrégée. Enfin, les profils des boues stockées et des lagunes apparaissent très différents des profils de lisier et de boues activées avec, pour les lagunes, une diversité apparente réduite (tassement des profils) et la présence de quelques pics très dominants. Cette différence souligne la forte évolution de la communauté microbienne du lisier traité après séparation et stockage de longue durée des phases séparées.

La comparaison précise des profils montre cependant que plusieurs pics co-migrent d'un profil à l'autre, traduisant la persistance probable de plusieurs populations dominantes du lisier jusque dans les boues et les lagunes. Ainsi, un pic très dominant dans le profil des lagunes semble correspondre au pic 4 des lisiers bruts.

L'analyse ACP (figure ci-dessous) confirme les résultats observés au niveau des profils le long de la filière. Pour les deux années 2007 et 2008 (F2 et F3 respectivement), plus de 90% de la variabilité des profils peut s'expliquer selon deux composantes qui regroupent les profils des boues (activées et stockées) entre eux. Les communautés microbiennes des boues se démarquent donc de celles des lisiers et des lagunes. Les profils de lagune sont toujours les plus éloignés.



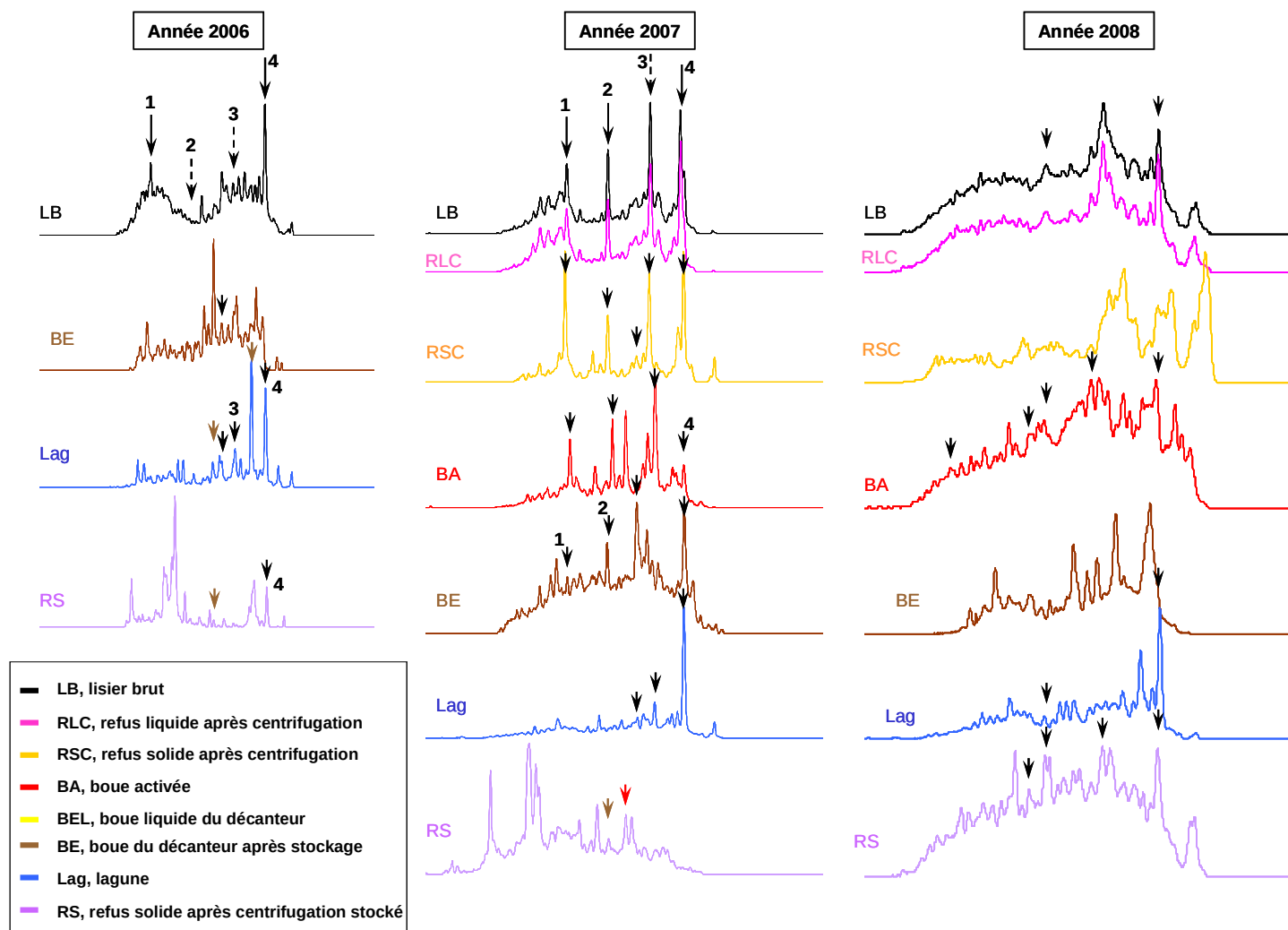
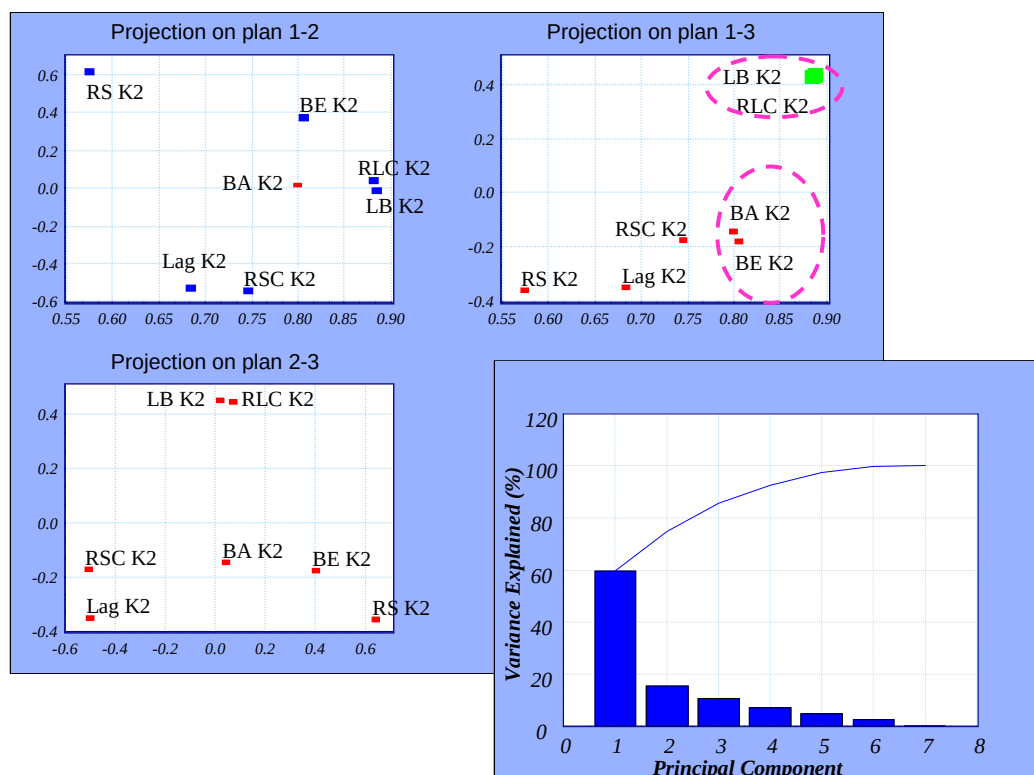


Figure 16 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 3. Les flèches numérotées de 1 à 4 sur les profils LB correspondent aux 4 pics dominants des lisiers bruts observés en 2006. Flèches pleines = co-migration correcte ; flèches pointillées = co-migration possible. Les flèches présentent sur les autres profils indiquent les pics communs entre les profils et qui semblent persister d'une étape à l'autre de la filière (pics noirs pour le LB, pics marrons pour les boues etc.).

La figure 16 présente les profils de la **filière de type 3** qui diffère de la précédente par la présence d'un décanteur centrifuge en amont du bassin d'aération. Comme précédemment, les profils SSCP obtenus l'année 2008 sont moins bien résolus que ceux des années 2006 et 2007. Cependant, leur alignement montre toujours une évolution qui suggère des changements de communauté microbienne tout au long de la filière. Le passage des lisiers au travers du décanteur centrifuge (testé en 2007 et 2008) n'affecte pas la diversité microbienne puisque les profils SSCP des fractions solides et liquides après centrifugation sont quasiment superposables et très similaires à ceux des lisiers bruts (sauf pour le RSC de 2008). Plusieurs populations dominantes des lisiers bruts persistent dans les boues activées, les boues stockées et la lagune (pics marqués par une flèche noire, dont les pics 2 et 4). Une fois stockés, les refus solides de centrifugation présentent des profils SSCP très différents de ceux des autres produits.

L'ACP réalisée sur les profils de la filière montre leur grande dispersion. Quelle que soit l'année considérée, il faut supposer 3 composantes pour expliquer environ 85% de la variabilité totale des profils. La figure ci-dessous montre les résultats de l'année 2007. La projection des corrélations sur les 3 plans possibles montre un regroupement d'une part, du lisier brut (LB) avec la sortie liquide de la centrifugeuse (RSL) et d'autre part, de la boue activée avec la boue stockée. Ces regroupements sont logiques au regard des profils observés dans la figure 16. En revanche, l'absence de regroupement de la sortie solide de la centrifugeuse avec le LB et le RSL est plus problématique. Il semblerait qu'elle résulte d'un artefact lié à un problème d'alignement de ce profil particulier dans Safus.



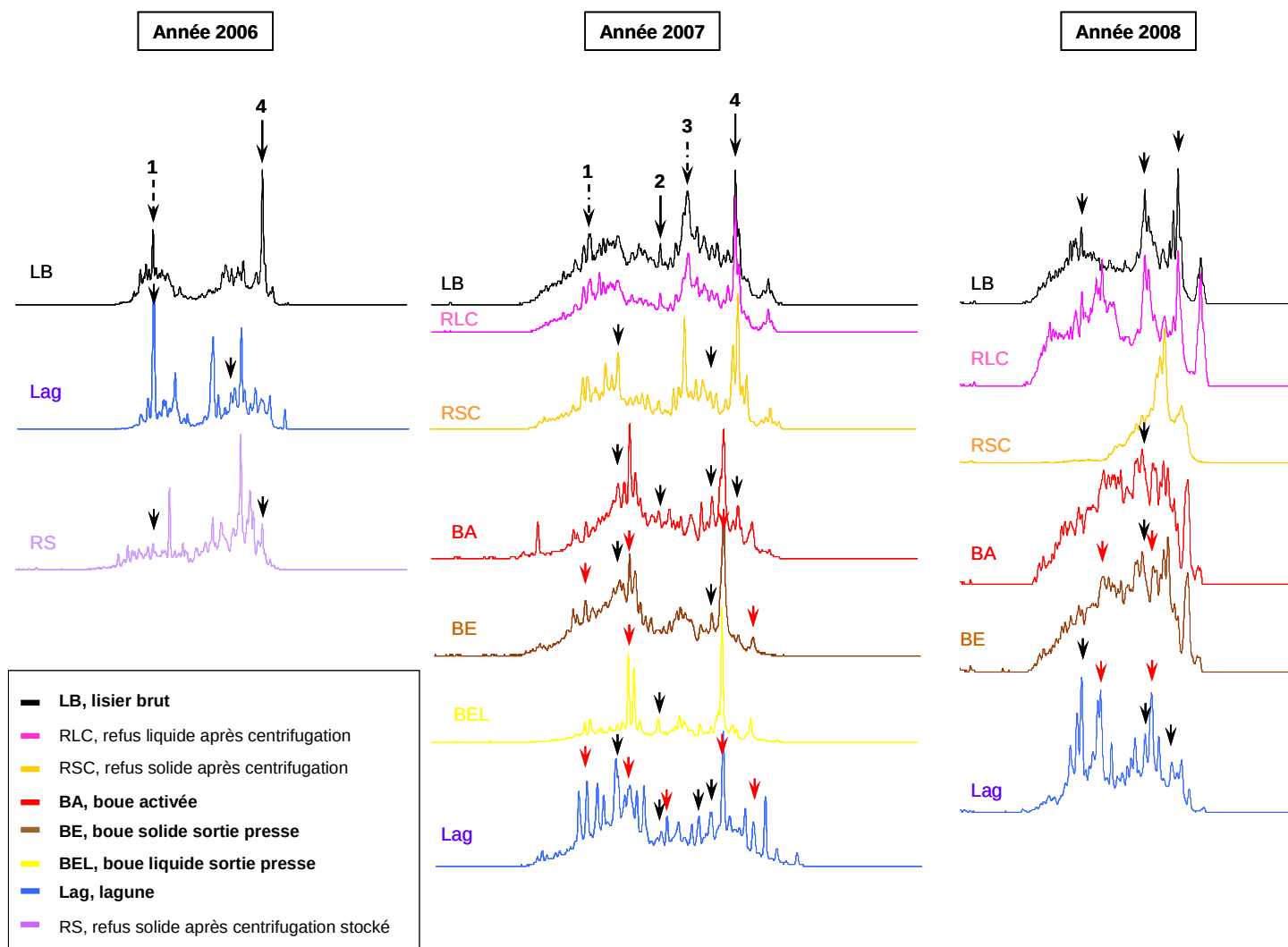
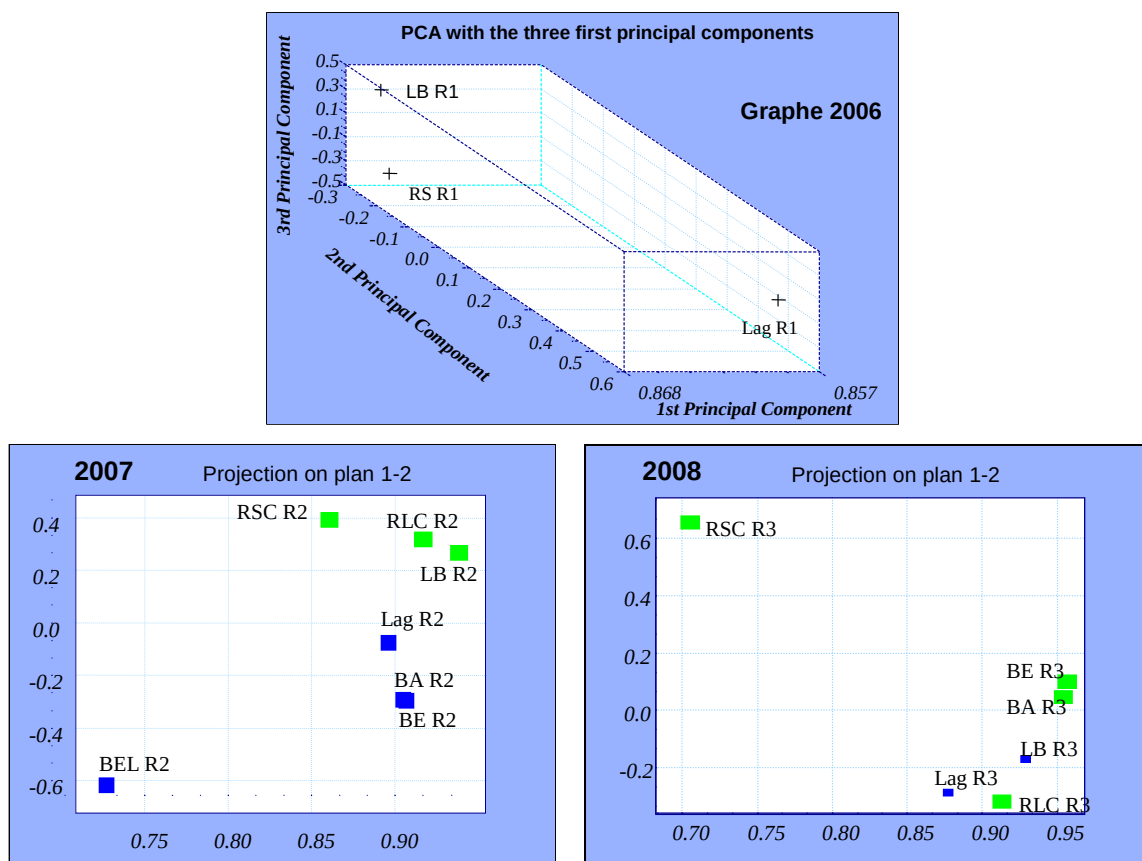


Figure 17 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales de la filière de type 4. Les flèches numérotées de 1 à 4 sur les profils LB correspondent aux 4 pics dominants des lisiers bruts observés en 2006. Flèches pleines = co-migration correcte ; flèches pointillées = co-migration possible. Les flèches présentes sur les autres profils indiquent les pics communs entre les profils et qui semblent persister d'une étape à l'autre de la filière (pics noirs pour le LB, pics marrons pour les boues etc.).

La figure 17 présente les profils SSCP de la **filière de type 4**. Cette filière diffère de la filière de type 3 par la présence d'un filtre à bande à la place du décanteur pour séparer les phases liquide et solide de la boue activée. Comme pour la filière de type 3, les profils SSCP obtenus l'année 2008 sont moins bien résolus que ceux des années 2006 et 2007. Cependant, ils confirment quand même que la majorité des populations dominantes du lisier brut sont visibles dans les refus liquides et solides en sortie du décanteur centrifuge (sauf le refus solide de 2008). En 2007, les profils des deux refus sont quasiment superposables démontrant l'absence de sélection dans la répartition des groupes microbiens entre les fractions liquide et solide des refus. Ensuite, les profils des boues activées présentent une forte évolution par rapport aux lisiers malgré quelques pics qui persistent. Assez logiquement, le passage de la boue dans le filtre à bande n'altère pas la diversité des populations retrouvées dans les sorties liquide et solide de l'appareil qui présentent les mêmes populations que la boue activée (année 2007 et 2008). Enfin, les profils observés dans les lagunes diffèrent de ceux des deux filières précédentes dans le sens où ils présentent plusieurs populations très dominantes dont plusieurs semblent avoir persisté depuis le lisier.

Les ACP effectuées sur la filière donnent des résultats en accord avec les profils. En 2006, les profils sont tellement différents qu'il faut 3 composantes pour expliquer 100% de leur variabilité (graphes en trois dimensions ci-dessous). Ce qui revient à dire que c'est leur nature même qui les sépare. Pour les années 2007 et 2008, deux composantes suffisent à expliquer 90% de la variabilité. On retrouve bien la similarité des profils LB-RLC-RSC d'une part et BA-BE d'autre part en 2007, ainsi que la divergence du profil RSC en 2008.



3.3.1e. Conclusions sur l'analyse des communautés microbiennes par PCR-SSCP et ACP

Concernant les filières de traitement des lisiers, les résultats importants obtenus par cette approche sont :

1. la confirmation que le simple stockage anaérobie et les traitements physiques (centrifugation, décantation) n'ont pas un réel impact au niveau de la communauté bactérienne des lisiers. Par contre, l'application des traitements biologiques (aération, stockage des boues et des refus solides, lagunage) conduit à des changements importants de cette communauté. Ces changements entraînent le plus souvent une disparition des populations dominantes du lisier sans toutefois les éliminer totalement. L'action majeure des traitements pourrait donc être liée au changement des paramètres environnementaux du milieu et à l'activité biologique des populations microbiennes en compétition.
2. la localisation de 4 pics et groupes de pics dominants, majoritairement présents dans les lisiers de l'année 2006, et dont certains semblent persister au travers des filières de traitement. Nous avons donc poursuivi cette étude par l'identification de ces pics et le développement d'outils pour tenter de les quantifier au travers de la filière.

3.3.2. Identification des pics dominant les profils SSCP des lisiers frais et stockés

L'alignement des profils SSCP des bactéries totales des 12 lisiers frais et 5 lisiers stockés analysés en 2006 avait révélé 4 pics dominants qui étaient visibles sur plus de 80% des profils (Figure 18). De manière intéressante, les profils SSCP réalisés sur les prélèvements de l'année 2007 présentaient les mêmes pics, avec une prévalence et une dominance plus marquées pour les pics 2 et 4. Cette observation suggérait que les espèces microbiennes correspondantes étaient non seulement très présentes dans les lisiers mais aussi stables d'une année sur l'autre. Nous avons donc tenté d'identifier les micro-organismes correspondants par clonage et séquençage de leurs ADN_r16S pour développer des systèmes moléculaires permettant leur détection par FISH ou PCR en temps réel.

Les fragments d'ADN_r 16S de deux échantillons de lisier brut (LB H et O) et deux échantillons de boues (BE N et O) ont été clonés selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes. Les clones obtenus ont été triés pour repérer ceux qui co-migraient avec les 4 pics dominants observés ci-dessus. Les fragments d'ADN des clones candidats ont été séquencés sur les deux brins afin de limiter les erreurs techniques de séquençage et d'augmenter la longueur de séquence disponible pour effectuer l'analyse phylogénétique nécessaire à l'identification des pics et à la recherche de sondes.

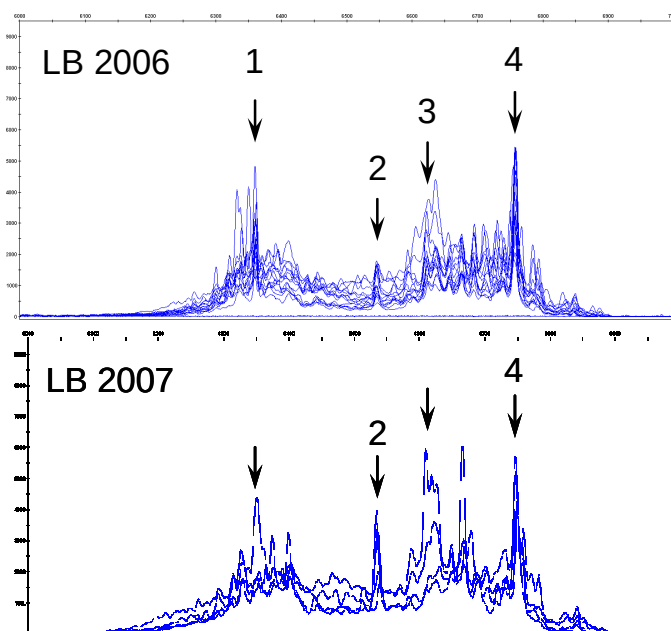


Figure 18 : Alignement des profils SSCP des bactéries totales des lisiers bruts et lisiers stockés analysés en 2006 et 2007. Les flèches indiquent les positions des 4 pics dominants présents dans la majorité des lisiers.

Une première recherche sur les bases de données internationales a montré que les espèces les plus proches génétiquement correspondaient toutes à des bactéries non cultivées (Tableau 20). La séquence du pic 1 est relativement proche (95% de similitude) de celle d'un *Clostridium* mis en

évidence après enrichissement en conditions anaérobies de sédiments marin. Le pic 4 a été identifié avec 99% de similitude à une bactérie du groupe *Bacteroidales* retrouvée dans un digesteur anaérobie de déchets solides. Tandis que les pics 2 et 3 ne sont que faiblement liés à des séquences appartenant aux *Bacteroidales*.

Tableau 20 : Identification des pics 1 à 4 par comparaison avec les bases de données

N° du pic dominant	% de similitude	Séquence la plus proche (environnement d'isolement de la séquence)	Numéro d'accèsion	Article
1	95	<i>Clostridiaceae</i> non cultivée (sédiments)	DQ080137	Yan <i>et al.</i> , 2006
2	92	<i>Bacteroidales</i> non cultivée (rumen)	EF436368	Mao <i>et al.</i> , 2007 (non publié)
3	92	<i>Bacteroidales</i> non cultivée (rhizosphère)	AB240481	Nakamura <i>et al.</i> , 2005 (non publié)
4	99	<i>Bacteroidales</i> non cultivée (digesteur anaérobie)	EF559197	Li <i>et al.</i> , 2007 (non publié)

Une analyse phylogénétique plus poussée a été réalisée à l'aide de l'environnement logiciel ARB. Les séquences ont été alignées sur une base de données de 12 000 séquences à l'aide du logiciel Clustal puis les alignements ont été vérifiés et édités manuellement. Les séquences corrigées et alignées ont permis la reconstruction d'arbres phylogénétiques selon les méthodes du Neighbor-Joining ou du maximum de parcimonie. Un arbre simplifié est présenté en figure 19. Il confirme le rattachement du pic 1 au genre *Clostridium* et celui des pics 2, 3 et 4 à la famille des *Bacteroides*.

Conclusion

Les 4 pics observés comme dominants dans les lisiers bruts et stockés ont été identifiés comme des micro-organismes appartenant aux groupes au genre *Clostridium* et à la famille des *Bacteroides*. Ils sont proches de micro-organismes observés dans l'environnement et n'appartiennent pas à des groupes potentiellement pathogènes.

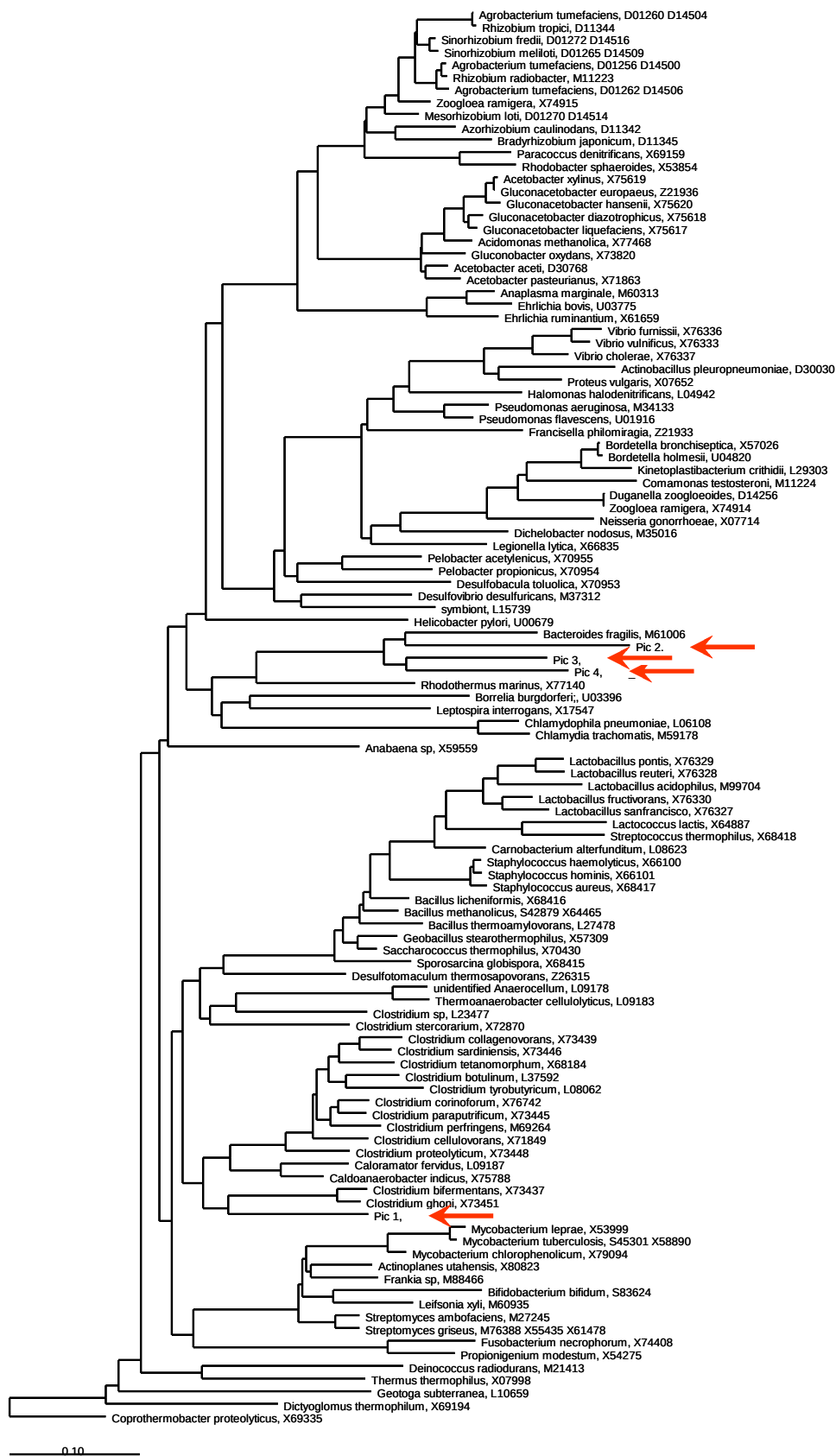


Figure 19 : Positionnement phylogénétique des séquences des 4 pics dominants observés dans les lisiers bruts et stockés des prélèvements de l'année 2006.

Page vierge

3.3.3. Suivi des populations dominantes dans une filière par technique FISH

A ce stade du projet, nous avons dû faire un choix sur le type de technique à utiliser pour suivre, dans les filières, les populations dominantes identifiées précédemment. En effet, nous pouvions opter soit pour la technique de PCR en temps réel, soit pour la technique d'hybridation *in situ* par microscopie à fluorescence (FISH). Nous avons choisi cette seconde option pour 2 raisons : (1) le laboratoire de microbiologie de l'Unité HBAN du Cemagref d'Antony est spécialisé dans la technique FISH et (2) le développement de la technique de PCR en temps réel pour le suivi des contaminations fécales dans les procédés de traitement et l'environnement a fait l'objet d'un autre projet financé par l'AFSSET (projet Traces). Les personnes intéressées par cette approche pourront trouver les résultats dans le rapport du projet Traces et dans le manuscrit de thèse de Romain Marti (boursier ADEME) qui devraient être disponibles fin 2009.

3.3.3a. Essais de faisabilité de la techniques FISH sur des échantillons de lisiers

Des essais préliminaires d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ont été effectués sur 9 échantillons provenant de 4 sites différents (Tableau 21) et fixés selon deux méthodes : le PFA 4% qui favorise la conservation et l'hybridation des bactéries à Gram négatif et l'éthanol qui favorise l'hybridation des bactéries à Gram positif. Des sondes générales ciblant les deux grands domaines microbiens des Bactéries et des Archées (qui contiennent les espèces méthanogènes) ont été utilisées en parallèle d'échantillons contrôles provenant de digesteurs anaérobies industriels.

Tableau 21 : échantillons évalués en FISH

Elevage	Type de traitement	Prélèvements
B	1	Lisier brut frais, Lisier brut stocké
E	1	Lisier brut stocké
K	3	Lisier brut, Boue aérée, Lagune
Q	4	Lisier brut, Boue aérée, Lagune

La figure 20 montre les résultats obtenus sur un même champ microscopique lors des hybridations effectuées sur l'échantillon de contrôle. Alors que les micro-organismes sont difficilement distinguables en microscopie classique (Image 20d), ils deviennent visibles en épifluorescence grâce à la technique FISH. Les Archées sont visualisées à l'aide du filtre bleu (20a), tandis que les Bactéries sont visibles à l'aide du filtre rouge (zones brillantes en 20b, les zones mates sont du bruit de fond). Le filtre vert permet de détecter le bruit de fond et l'autofluorescence des échantillons qui est assez importante (20c). La superposition des 4 images conduit à la l'image 20e où les bactéries apparaissent en jaune (rouge + vert) et le bruit de fond en vert.

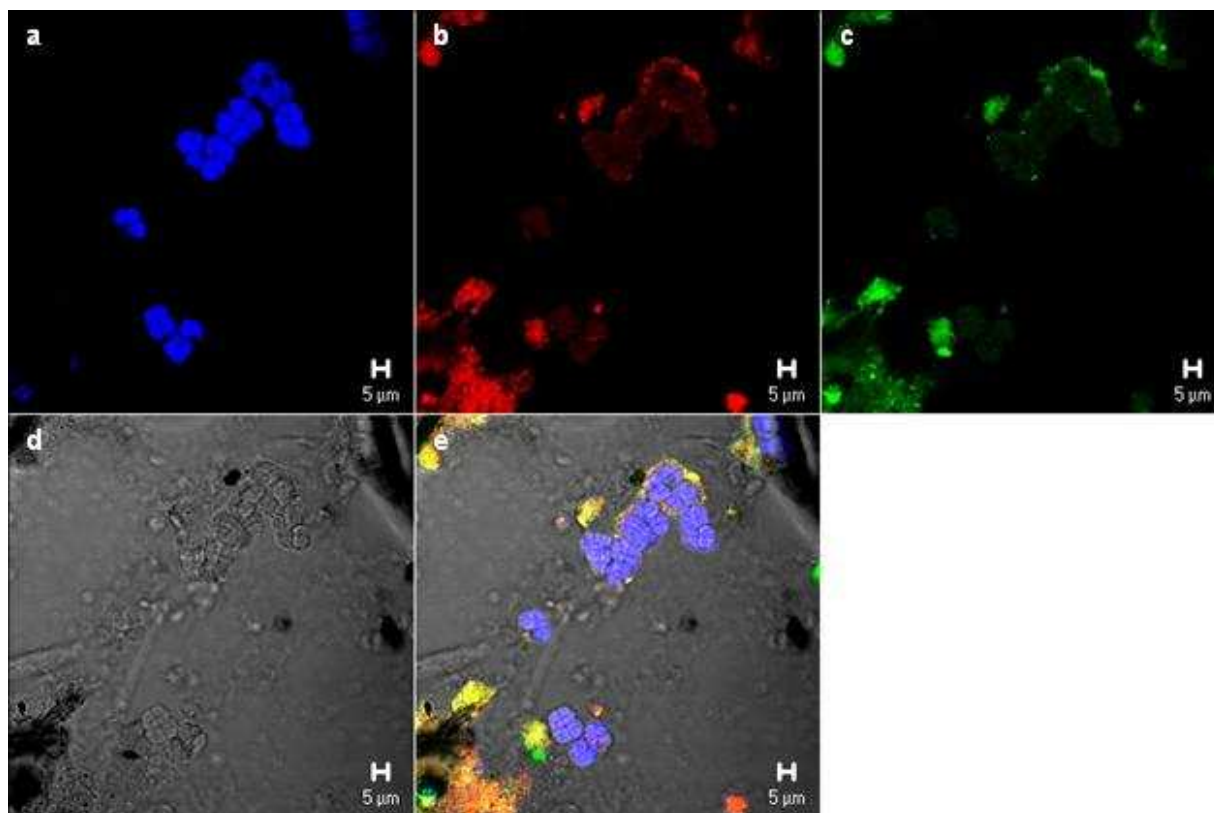
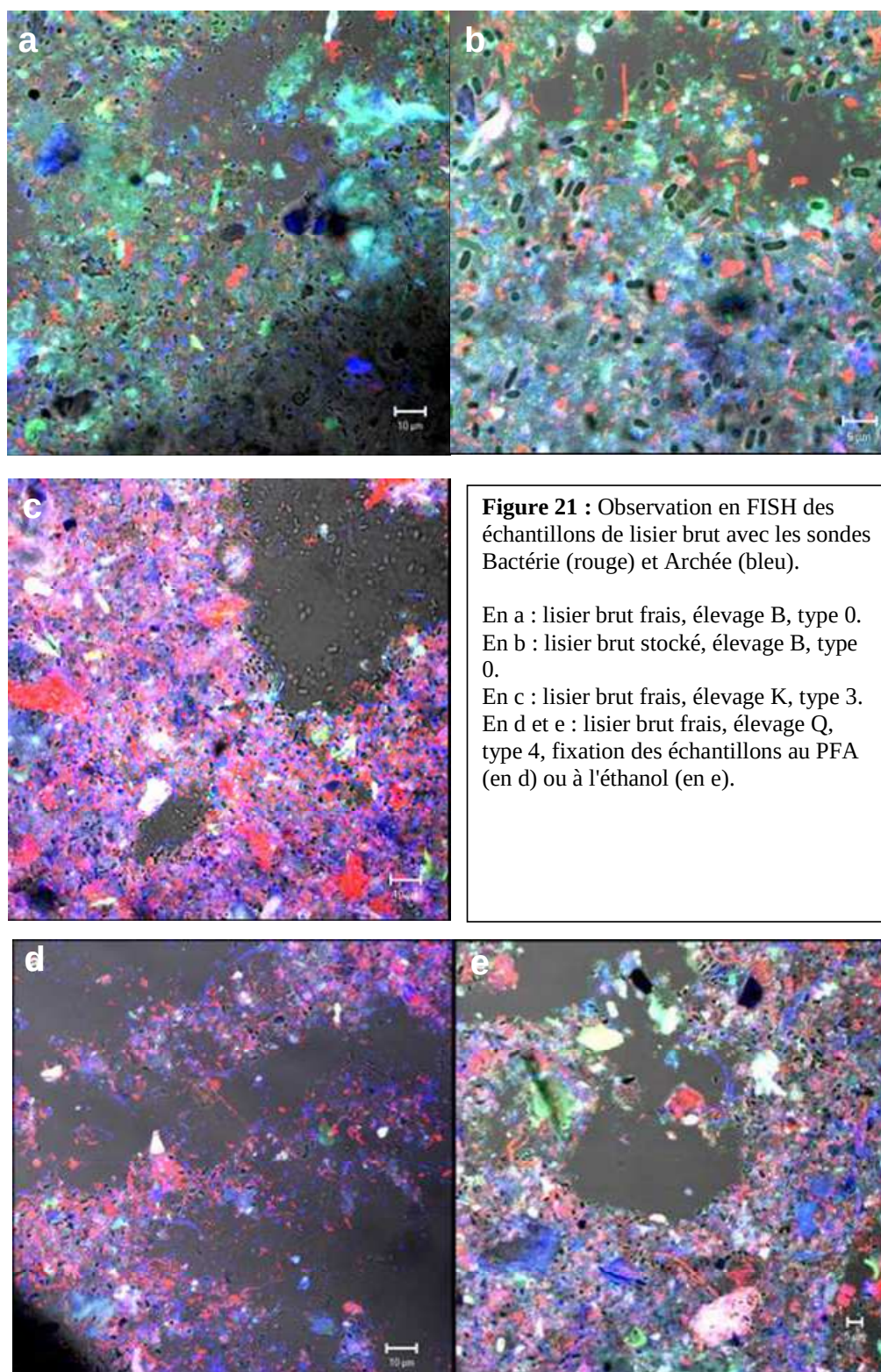


Figure 20 : Observation au MCBL de l'échantillon contrôle positif hybridé par la technique FISH avec les sondes Bactéries (EUB338 I, II et III) marquées au Cy^3 et la sonde Archée (Arc915) marquée au Cy^5 . Pour un même champ microscopique, nous observons : en a, les archées (bleu) ; en b, les Bactéries (rouge) ; en c, le bruit de fond et l'auto-fluorescence (vert) ; en d, les cellules sans coloration (contraste interférentiel différentiel, DIC) et en e, la superposition des 4 images.

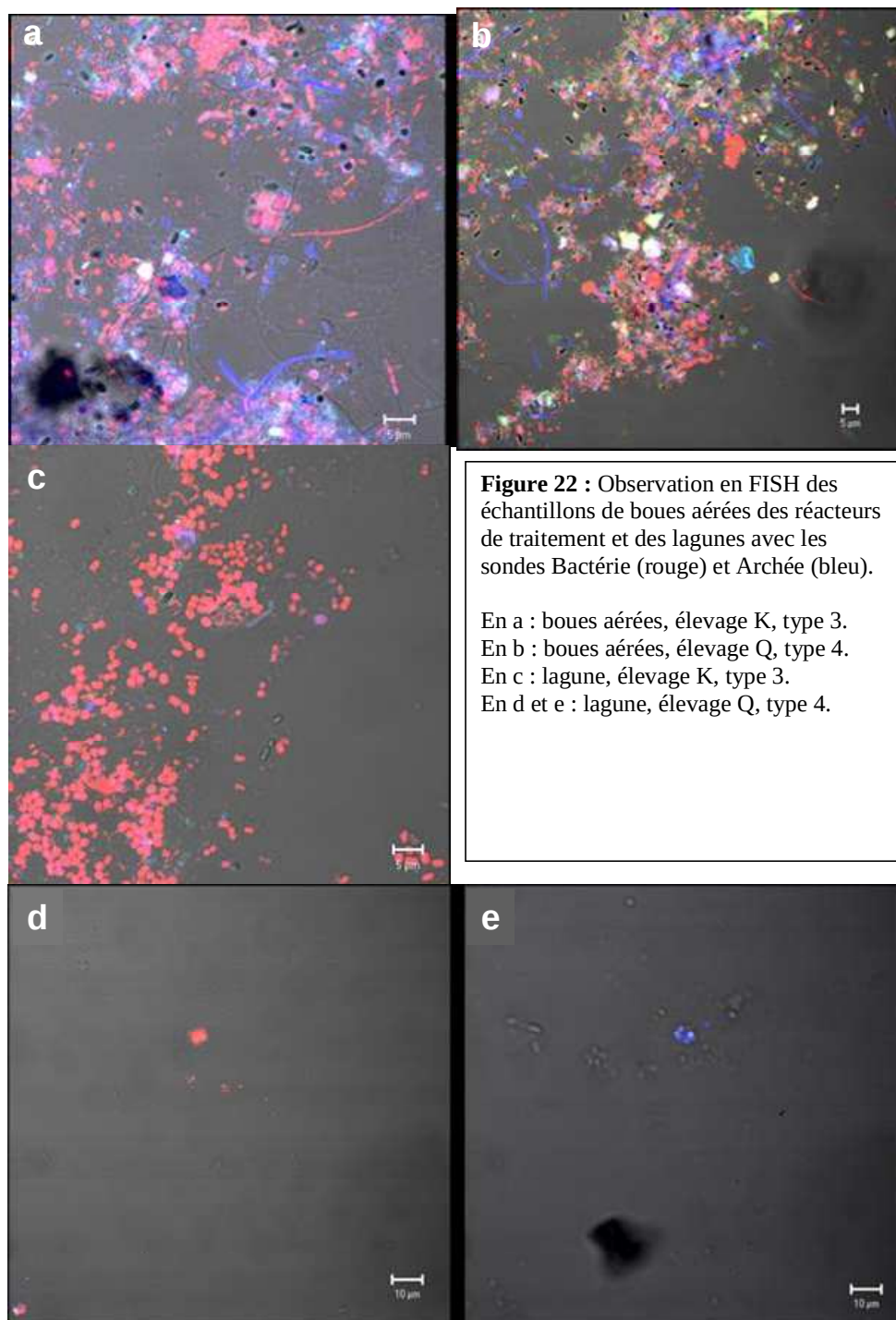
Les observations effectuées sur les échantillons de lisier, de boues aérées des réacteurs de traitement et des lagunes sont résumées sur les figures 21 et 22. Les lisiers bruts présentent des images très chargées où il est quelquefois difficile de distinguer clairement les micro-organismes (en rouge ou bleu) par rapport à l'autofluorescence du bruit de fond (en blanc et vert pâle) et aux débris et/ou cellules non marquées (en noir). Les figures 21a et b notamment montrent des formes ressemblant à de gros bacilles qui ne sont pas marquées par l'hybridation. Cette absence de marquage peut avoir trois origines (Amann *et al.*, 1995) :

- les sondes n'hybrident pas à l'espèce considérée. Cette hypothèse reste peu probable puisque nous avons utilisé des sondes très générales
- les sondes ne pénètrent pas dans les cellules. Il faut alors utiliser des protocoles de perméabilisation des parois et membranes cellulaires pour améliorer l'hybridation. Cependant, ces protocoles sont délicats à mettre en œuvre sur des échantillons complexes car ils peuvent conduire à la lyse des cellules les plus fragiles. Lors de ces essais préliminaires, les deux types de fixation des échantillons (PFA et éthanol) ont donné des résultats similaires concernant la qualité de l'hybridation et la proportion de cellules marquées (Figure 21d et e)
- le nombre d'ARN ribosomiques dans les cellules est trop faible pour que le signal hybridé soit visible au microscope. Le nombre de ribosomes présents dans les cellules dépend de l'état

physiologique cellulaire. Ainsi des cellules présentant une activité métabolique faible sont généralement difficiles à détecter en FISH. Cette hypothèse serait la plus plausible dans nos essais puisque seuls les échantillons des élevages de type 0 (lisiers bruts stockés des élevages B et E) ont montré des signaux faibles d'hybridation (Figure 21a et b, et données non montrées).



Pour les autres échantillons (Figures 21c-e et 22a-e), les micro-organismes marqués par le FISH apparaissent généralement sous la forme de floccs (amas cellulaires) assez denses. Bien que ces observations soient très qualitatives, la proportion d'Archées (en bleu) par rapport aux Bactéries (en rouge) semble diminuer nettement entre les échantillons de lisier brut, les boues aérées et la lagune. Cette observation est logique puisque les Archées connues à ce jour sont majoritairement anaérobies. Il est même presque étonnant de constater le nombre important d'Archées encore visibles, généralement sous la forme de clusters ou de filaments, dans le réacteur biologique aéré (Figure 22a et b).



En conclusion, les premiers essais de FISH étaient encourageants pour les échantillons de boues aérées des réacteurs biologiques et de lagunes. En revanche, ils laissaient présager des problèmes techniques pour la détection de groupes microbiens sous-dominants dans les lisiers bruts. En effet, le fort bruit de fond et la quantité élevée de débris allaient nous obliger à diluer énormément les échantillons pour obtenir des images convenables ce qui pouvait conduire à une élévation importante du seuil de détection de la méthode.

3.3.3b. Design de sondes spécifiques des séquences des pics 2 et 4 identifiés par SSCP et clonage.

Pour pouvoir visualiser par technique FISH les micro-organismes correspondant aux pics 2 et 4 identifiés précédemment, la première étape consiste à rechercher une séquence d'ADN qui leur est totalement spécifique. Les séquences d'ADNr 16S réalisées précédemment ont été alignées avec celles des bases de données et nous avons dessiné, à l'aide du logiciel ARB, une sonde spécifique à chaque pic : Bac650 et Bac151, respectivement (tableau 22). La séquence extraite du pic 2 appartient à la famille des *Prevotellaceae*. La séquence extraite du pic 4 appartient à l'ordre des *Bacteroidales*.

Comme contrôle d'hybridation, nous avons aussi recherché (à l'aide du site ProbeBase <http://www.microbial-ecology.de/probebase/default.asp>) des sondes plus générales de la classe des *Bacteroidetes*, qui pourraient hybrider aux micro-organismes des pics 2 et 4. Deux sondes ont été sélectionnées : Bac303 et CFB1082, respectivement. Bac303 a déjà été testée en FISH alors que CFB1082 non.

La capacité de ces sondes à s'hybrider aux séquences des pics 2 et 4 a été testée par ordinateur (tableau 22). CFB1082 semble ne pas s'hybrider à la population microbienne du Pic 2, tandis que la sonde Bac 303 semble ne pas s'hybrider à la population du pic 4. Cependant, pour chaque population microbienne (pic 2 ou 4) nous bénéficions d'une sonde spécifique et d'une sonde de groupe qui pourraient être utilisées en co-hybridation. L'utilisation de couples de sondes pour une même population de micro-organismes est une pratique courante qui permet de valider les observations par la co-localisation du signal des deux sondes.

Tableau 22. Caractéristiques des sondes utilisées

Sonde	Cible	Hybridation au	
		Pic 2	Pic 4
Bac650	Spécifique	+	-
Bac303	Générale	+	-
Bac151	Spécifique	-	+
CFB1082	Générale	-	+

Sonde	Cible	Séquence de la sonde (5'-3')	% formamide	Fluorophore	Référence
Bac650	Pic 2	GCCTCTTACGCACTCAAG	ND	Cy3	Cette étude
Bac303	Plupart des Bacteroidaceae, plupart des Prevotellaceae, quelques Porphyromonadaceae	CCAATGTGGGGGACCTT	0	FITC	Manz <i>et al.</i> ⁵
Bac151	Pic 4	GACCAAGTTTCCCTGGTG	ND	Cy3	Cette étude
CFB1082	Plupart des membres de la classe Bacteroidetes	TGGCACTTAAGCCGACAC	ND	Cy5	Weller <i>et al.</i> ⁶

3.3.3c. FISH à l'aide des sondes EUB338 (Cy3) + Bac303 (FITC) + CFB1082 (Cy5)

Tous les échantillons des élevages B, F, K et R de l'année 2006 fixés au PFA ont été testés avec le mélange de sondes EUB338 Cy3, Bac303 FITC et CFB1082 Cy5 à 0% de formamide.

Les résultats ont montré un signal positif avec la sonde générale (EUB338) démontrant que la fixation et l'hybridation des bactéries avait fonctionné correctement. Cependant, aucun signal n'a été observé avec les autres sondes, et ce sur l'ensemble des échantillons (figure 23). Il n'y avait donc pas d'hybridation des sondes Bac303 et CFB1082. Le signal bleu observé figure 23 correspond à du bruit de fond car les signaux EUB338 et CFB1082 ne sont pas co-localisés.

Le fait que la sonde Bac303 a déjà été testée pour la technique FISH à 0% de formamide (cf ProbeBase + littérature) indique que ce n'est pas la sonde qui ne s'hybride pas mais que ce sont les groupes microbiens ciblés qui sont absents ou non détectables dans les échantillons. On peut émettre l'hypothèse qu'il en est de même pour la sonde CFB1082 bien que celle-ci n'ait jamais été testée en FISH.

⁵ Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. Microbiol. 142: 1097-1106, 1996.

⁶ 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the in situ detection of members of the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. System. Appl. Microbiol. 23: 107-114, 2000.

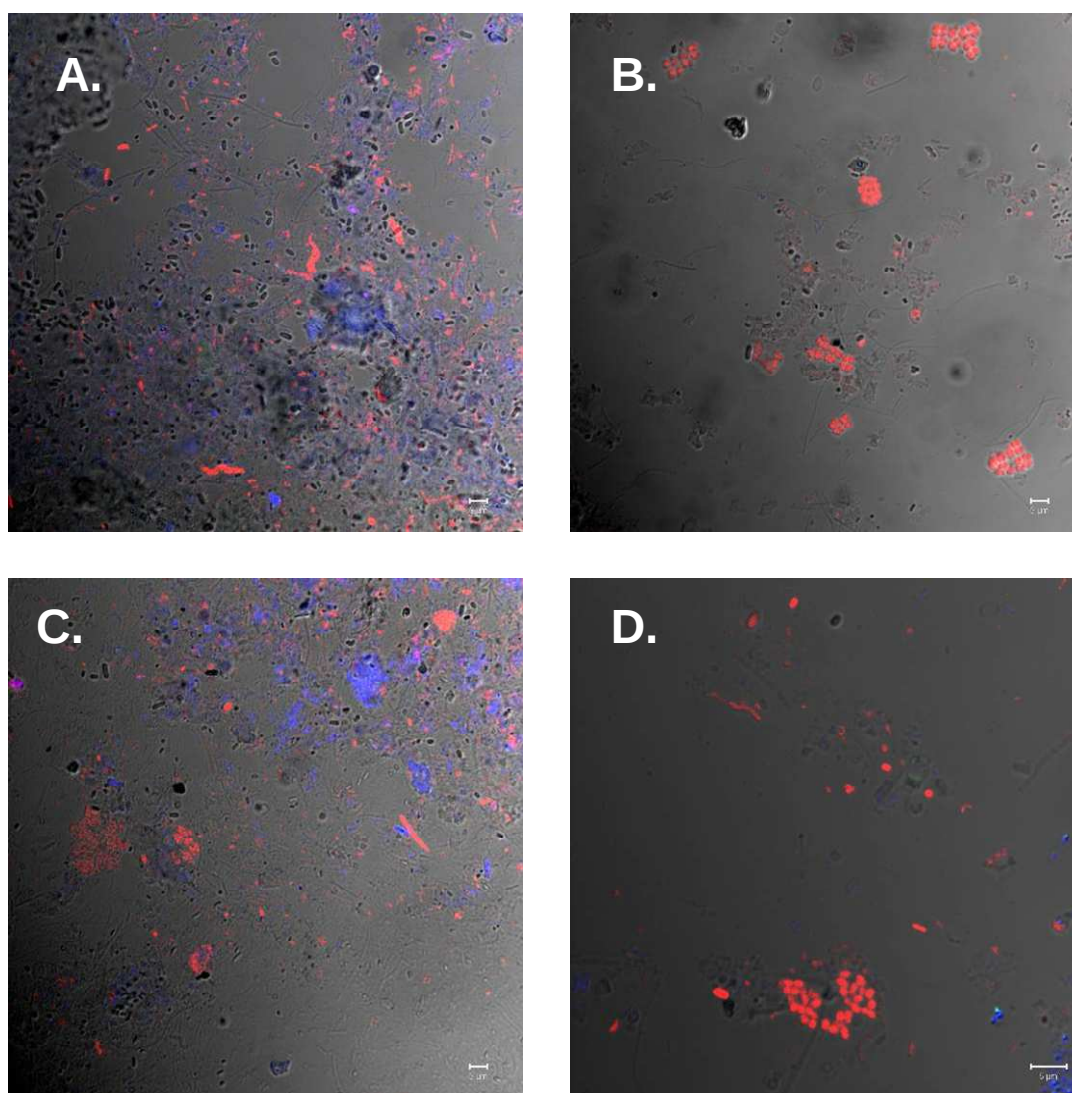


Figure 23. Hybridation in situ de 4 échantillons de boues activées à l'aide des sondes EUB338 Cy3 (rouge), Bac303 FITC (vert), CFB1082 Cy5 (bleu).
 A. Boues activées de l'élevage B ; B. Boues activées de l'élevage F ; C. Boues activées de l'élevage K ;
 D. Boues activées de l'élevage R.

3.3.3d. FISH à l'aide des sondes EUB338 (FITC) + Bac650 (Cy3) ou Bac151 (Cy3)

Malgré les résultats négatifs observés précédemment, nous avons tout de même testé nos sondes spécifiques sur les échantillons des élevages B, F, K et R fixés au PFA en 2006. Les hybridations ont été réalisées avec le mélange de sondes EUB338 FITC et Bac650 Cy3 ou Bac151 Cy3 à 10% de formamide. Là encore, la sonde générale a donné un signal positif alors que les sondes spécifiques Bac650 et Bac151 n'ont pas donné de signal (Figure 24).

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment avec les sondes plus générales (Bac303 et CFB1082). Les groupes ciblés par les 2 sondes dessinées ne semblent pas être visibles ou détectables dans les échantillons.

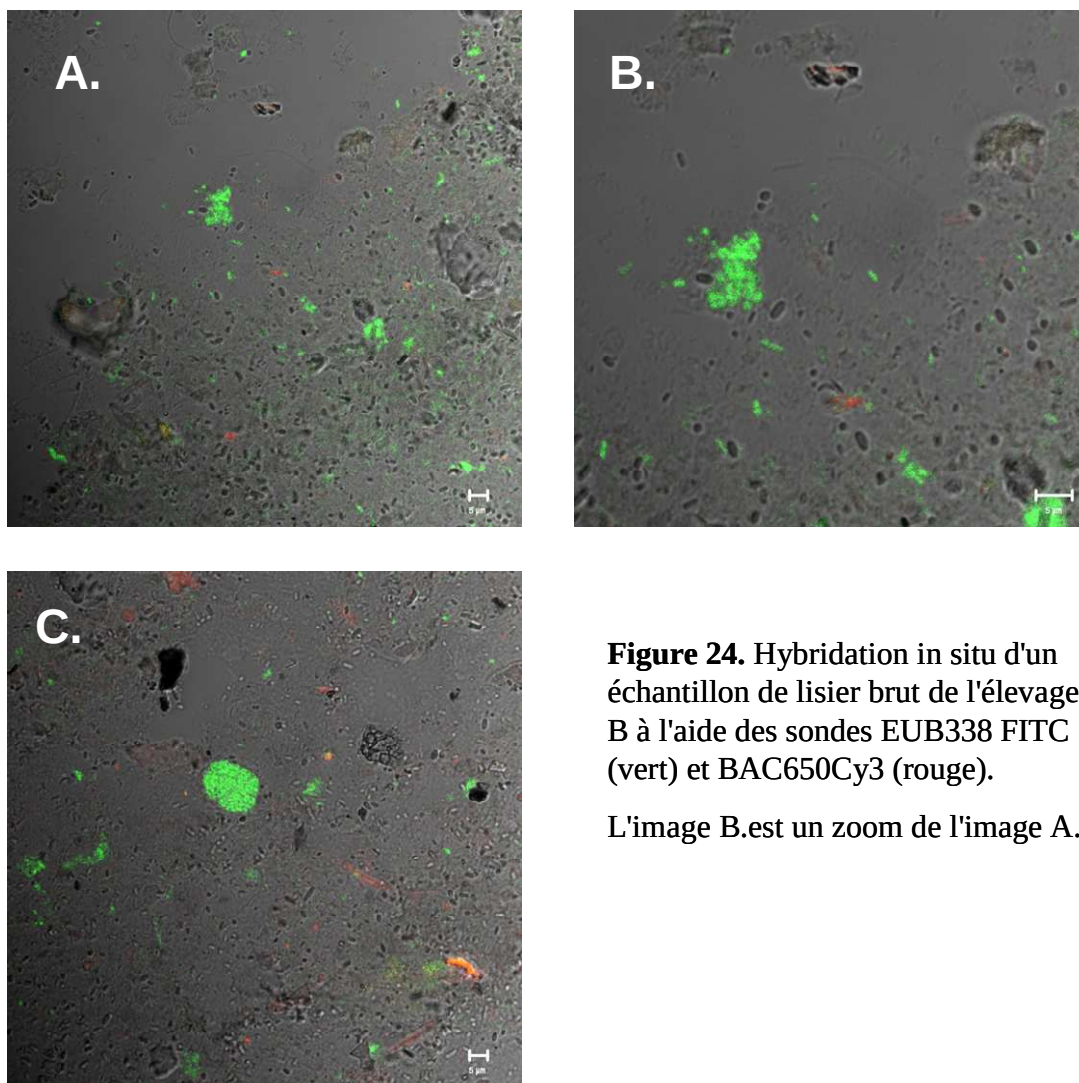


Figure 24. Hybridation in situ d'un échantillon de lisier brut de l'élevage B à l'aide des sondes EUB338 FITC (vert) et BAC650Cy3 (rouge).

L'image B. est un zoom de l'image A.

3.3.3e. Conclusion des essais de FISH

Les essais réalisés en FISH n'ont pas permis de détecter les populations microbiennes correspondant aux pics 2 et 4.

Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ce résultat : problème de sonde, de stockage et ou de perméabilisation des échantillons, d'intensité du signal, ou encore de seuil de détection. Le problème de sonde est à exclure pour au moins une des sondes qui a déjà été utilisées dans la littérature et a donné des résultats positifs. De même, le fait que les sondes générales donnent un signal positif en hybridation montre que le stockage et les conditions d'hybridation des échantillons sont corrects. Les deux hypothèses qui persistent sont : (1) un signal trop faible pour les populations ciblées. Ce phénomène pourrait être dû à un faible nombre de ribosomes dans les populations ciblées du fait que les *Bacteroidales* sont des micro-organismes anaérobies stricts et que leur manipulation lors des expérimentations peut avoir affecté leur viabilité. (2) un nombre de micro-organismes cibles inférieur au seuil de détection de la méthode. Ce seuil dépend de deux facteurs : le nombre minimum de bactéries cibles présentes dans l'échantillon permettant de visualiser au moins 1 bactérie par champ

microscopique hybridé et la proportion de cette cible dans le nombre total de bactéries permettant au signal de fluorescence de s'extraire du bruit de fond. Par de simples calculs des surfaces d'échantillon analysées, de la dilution de celui-ci et de la surface de champ microscopique observée, il apparaît que le seuil de détection de la technique peut être évalué à environ 10^6 bactéries par mL d'échantillon, avec une cible présente à plus de 1/1000 du total. Dans ces conditions, nous aurions dû en théorie détecter un signal dans les échantillons de lisier brut et stockés puisque des essais menés en PCR en temps réel montrent en moyenne un nombre de bactéries totales entre 10^8 et 10^9 bactéries par mL de lisier et un nombre de *Bacteroidales* d'environ 10^7 à 10^8 bactéries / mL (R. Marti, communication personnelle). Ces proportions sont aussi en accord avec le fait que les pics ciblés sont dominants dans les profils SSCP et représentent donc selon Loisel *et al.* (2006) plus de 1% du total. En revanche, il semblerait que la proportion de *Bacteroidales* chute rapidement en dessous du seuil de $1/1000^{\text{ème}}$ des bactéries totales dans les échantillons de boues activées et de lagunes, les rendant ainsi indétectables par FISH.

Nous n'avons donc pas d'explication rationnelle à ce jour pour ce résultat négatif. La difficulté de ce type d'analyse est de devoir développer une sonde contre une population de micro-organismes encore non isolée et non cultivée et que nous ne pouvons donc pas optimiser les conditions d'hybridation de manière expérimentale puisque nous ne possédons pas d'isolat de la population en question.

4. DISCUSSION

4.1. Paramètres physico-chimiques des lisiers et effluents

Les analyses physico-chimiques effectuées sur les lisiers et les différents effluents des filières de traitement montrent une grande variabilité des données mais qui restent dans les limites de celles observées dans la littérature (Levasseur P., 1998 ; Loyon *et al.*, 2003).

En l'absence de traitement aérobie, on observe une dégradation partielle de la matière organique des lisiers pendant le stockage qui conduit à une présence importante d'ammonium et d'AGV dans les lisiers stockés. En présence d'un traitement aérobie, l'azote ammoniacal et les AGV sont dégradés au niveau du traitement biologique et les boues stockées destinées à l'épandage contiennent une teneur réduite en NTK, ammonium et DCO. L'eau des lagunes utilisée en irrigation contient des teneurs basses en azote et matière organique. Elle présente un pH basique autour de 9.

Les fortes différences observées d'une année à l'autre concernant généralement les mesures de matières sèches et de DCO_{tot} tandis que les mesures des solubles sont plus homogènes. Ce problème est une conséquence directe de l'hétérogénéité de composition des lisiers bruts qui contiennent des matières de nature très différentes et de comportements variés : matières solubles, particulaires et colloïdales qui décantent à des vitesses différentes et matière organique inerte, ou plus moins biodégradable, qui évolue dans le temps de stockage. Malgré, tous nos efforts, ces éléments concourent à des erreurs d'échantillonnage (au prélèvement sur site mais aussi lors des transferts de flacons en laboratoire) qui ne sont pas gommées par la réalisation des triplicats. Un autre paramètre important selon F. Béline (communication personnelle) est le jour de réalisation du prélèvement. En effet, lors d'une étude bimensuelle de biodégradabilité des lisiers bruts, menée courant 2008 pendant plusieurs mois sur un même élevage, il a été observé une grande variabilité des solides et donc des MS et de la DCO_{tot} dans les prélèvements en fonction du jour de prélèvement. Cette variabilité s'explique par les apports discontinus des matières de vidange des préfosse des bâtiments d'élevage et des stades physiologiques des animaux correspondants (lisier d'engraissement plus chargé que celui de post sevrage ou maternité en fonction de l'alimentation des animaux, par exemple). Ces variations sont beaucoup moins importantes lorsque l'on considère les matières solubles (ammonium et DCO_{sol}).

4.2. Dénombrement des germes indicateurs et pathogènes des lisiers et des effluents

Peu d'études de terrain ont été consacrées à l'impact des traitements du lisier de porcs sur les bactéries entériques alors que celles-ci sont susceptibles d'être disséminées dans l'environnement lors de l'épandage. A notre connaissance, seules les études de Côté *et al.*, (2006), Chinivasagam *et al.*, (2004) et Hutchison *et al.*, (2004a) qui ont été menées sur un nombre important d'élevages, permettent d'évaluer le niveau de contamination des effluents émis par les élevages porcins dans une région ou un pays donné. Ainsi, Côté *et al.*, (2006a)

ont déterminé les concentrations en *E. coli* dans les lisiers bruts de 32 élevages porcins canadiens et ont recherché la présence de *Salmonella*, de *Yersinia enterocolitica* et de *Cryptosporidium* qu'ils ont retrouvés respectivement dans 37%, 9% et 3% des effluents. Chinivasagam *et al.*, (2004) ont dénombré les coliformes fécaux et *E. coli* ainsi que 4 micro-organismes pathogènes (*Erysipelothrix*, rotavirus, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*) dans les lisiers bruts et stockés en lagunes de 13 élevages australiens. Alors que les rotavirus et *Erysipelothrix* n'ont pas été mis en évidence, *Salmonella* et *Campylobacter jejuni* ont été détectés dans 31% et 100% des lisiers. Enfin, en Angleterre, Hutchison *et al.*, (2004a) ont étudié la prévalence de 6 micro-organismes pathogènes responsables de zoonoses (*Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Cryptosporidium* et *Giardia*) dans les effluents d'élevages porcins, bovins, ovins et aviaires et ont comparé l'état sanitaire de 126 lisiers de porcs frais à 58 lisiers stockés en fosse anaérobie. Dans les lisiers de porcs frais, la prévalence de ces 6 micro-organismes pathogènes était respectivement de 7,9%, 13,5%, 11,9%, 19,8%, 13,5% et 2,4%. Bien que les techniques culturales utilisées et les méthodes d'échantillonnages diffèrent d'un auteur à l'autre, les résultats de ces trois études soulignent l'existence d'un risque sanitaire non seulement dans le lisier frais mais aussi dans les effluents après stockage. Par ailleurs comme l'ont souligné Arrus *et al.*, (2005), le risque sanitaire est accentué en période hivernale en raison de l'augmentation de la survie des germes à basse température.

Au cours de notre étude réalisée en Bretagne, nous nous sommes fixés d'évaluer non seulement l'état sanitaire des lisiers mais aussi de comparer l'impact des différentes filières de traitement les plus couramment utilisées dans cette région qui concentre à elle seule 60% de la production porcine. Nous avons de plus évalué l'effet de chaque étape de traitement sur deux années consécutives.

4.2.1. Impact des traitements sur les germes indicateurs de traitement

Les concentrations en *E. coli* et en entérocoque observées dans les lisiers bruts, comprises entre 10^2 et 10^5 germes / g, fluctuent d'un élevage à l'autre. Ces résultats sont en accord avec les valeurs très variables observées dans les études menées dans d'autres pays. Ainsi, les teneurs en coliformes fécaux ou en *E. coli* varient selon les auteurs de 10 à 10^6 bactéries par gramme de lisier (Hill et Sobsey, 1998, Hill et Sobsey, 2003 ; Chinivasagam *et al.*, 2004 ; Vanotti *et al.*, 2005 ; Côté *et al.*, 2006). Par ailleurs, Côté *et al.* (2006) ont observé des écarts de 5 unités logarithmiques des concentrations en *E. coli* sur 32 lisiers issus d'élevages localisés dans 2 régions du Québec. Hill et Sobsey (2003) rapportent également des différences de 3 unités logarithmiques sur des valeurs de *E. coli* et d'entérocoques mesurées dans les lisiers bruts de 4 élevages de Caroline du Nord. Il est cependant difficile de relier ces fluctuations au mode de conduite des élevages. Dans notre étude, ni la

teneur en matière sèche, ni la durée de stockage du lisier brut en fosse ne semblent influencer le nombre de germes indicateurs qui ne varie pas significativement entre les périodes de stockage courtes (<1 mois) et longues (de 6 à 9 mois). Pourtant, l'allongement de la durée de stockage entraîne une diminution significative des teneurs en germes entériques. Côté *et al.* (2006) ont en effet observé que les concentrations en *E. coli* initialement comprises entre 10^3 et 10^4 germes /g dans les lisiers diminuaient de 4 $\log_{10}$ en 54 à 114 jours de stockage. Hutchison *et al.* (2005a) qui ontensemencé artificiellement des micro-organismes d'origine entérique dans du lisier, ont aussi observé une disparition progressive des bactéries avec un abattement de 3 $\log_{10}$ après 2 mois de stockage. La persistance des germes indicateurs dans les lisiers, même après 9 mois de stockage, n'est cependant pas surprenante dans la mesure où les fosses sont remplies séquentiellement ce qui induit obligatoirement une surestimation de la survie des germes comme l'ont souligné Hutchison *et al.* (2005b).

Indépendamment du niveau initial en germes indicateurs, l'effet cumulatif de la digestion aérobie du lisier suivie du stockage entraîne un niveau de concentration 10 à 100 fois plus faible dans les boues destinées à l'épandage. L'abattement des concentrations est plus élevé pour *E. coli* que pour les entérocoques comme l'ont aussi rapporté Hill et Sobsey (2003). Il faut toutefois souligner que *E. coli* n'est pas toujours l'indicateur le plus sensible. Ainsi, Placha *et al.* (2001) rapportent une survie des entérocoques inférieure à celle des coliformes fécaux dans la fraction solide d'un lisier maintenu à 21-22°C alors que Pourcher *et al.* (2005) ont observé une survie identique des deux indicateurs au cours du compostage de boues de station d'épuration.

Enfin, même s'il est observé une diminution des germes au cours des traitements et ceci, quelles que soient les études citées dans la littérature, il est difficile d'énoncer des règles générales d'efficacité des traitements. Ainsi pour les 10 élevages de types 1 à 4 possédant un traitement biologique de l'azote, les abattements des concentrations entre les lisiers bruts et les boues stockées varient de 1,6 à 2,6 $\log_{10}$ pour *E. coli* et de 0,3 à 1,9 $\log_{10}$ pour les entérocoques sans que l'on puisse associer ces différences aux types de procédés de traitement. Ces données sont en accord avec les résultats de Chinivasagam *et al.* (2004) qui ont comparé les teneurs en *E. coli* dans des lisiers bruts et dans des lagunes de stockage de 13 élevages et qui ont également observé des abattements très variables d'un élevage à l'autre (de 0.67 à 3.9 $\log_{10}$). De même, Hill et Sobsey (2003) qui ont comparé l'état sanitaire de 4 lisiers bruts à celui des lisiers traités par digestion anaérobie ou stockage en lagune, ont observé des abattements de 1,5 à 2,3 $\log_{10}$ pour *E. coli* et de 1 à 1,9 $\log_{10}$ pour les entérocoques.

Si les différences de concentrations entre les lisiers et les boues sont relativement faibles, les deux autres sous-produits sont en revanche nettement moins contaminés. Six des huit lagunes étudiées présentent des concentrations en *E. coli* et en entérocoques inférieures ou égales à 20 germes / mL. Dans les 2 autres lagunes, les teneurs en indicateurs ne dépassent pas $4,5 \cdot 10^2$ germes / mL.

L'abattement global des concentrations des deux indicateurs entre les lisiers bruts et les lagunes varie de 3,4 à 5,5 selon les élevages. L'absence ou la très faible teneur des deux indicateurs peut s'expliquer par l'action conjuguée de plusieurs facteurs tels que la durée du stockage dans la lagune qui excède 9 mois, la faible quantité d'éléments nutritifs, défavorable à la croissance des germes entériques, l'effet inhibiteur des UV, ou la présence d'une chaîne trophique comprenant notamment des protozoaires bactériophages. L'abattement important des germes (supérieur à $2,7 \log_{10}$) dans les refus solides est probablement dû aux températures élevées, de l'ordre de 70°C , relevées lors des prélèvements. Le simple stockage en tas du refus de centrifugation solide pendant plusieurs semaines, semble conduire à une hygiénisation de ce sous-produit. Il est toutefois important de souligner qu'en absence de montée en température du refus de séparation, les coliformes fécaux et les entérocoques survivent plusieurs semaines. Placha *et al.* (2001) ont ainsi observé un abattement de ces deux germes ne dépassant pas $2 \log_{10}$ après 76 jours de stockage à température ambiante.

L'absence d'abattement des spores de *C. perfringens* et leur présence dans les lagunes et dans 3 des 4 refus de séparation confirment la plus grande résistance de ces germes au cours du traitement du lisier comme l'ont rapporté Hill et Sobsey (2003). Ce type de comportement souligne l'existence d'un risque microbiologique associé aux formes de résistance telles que les kystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium* dont la présence a été mise en évidence dans les lisiers. Hutchison *et al.* (2004a) ont ainsi détecté des *Cryptosporidium* dans 13,5 % des lisiers bruts et dans 5,2 des lisiers stockés en fosse.

L'impact de chaque étape de traitement sur les concentrations en germes entériques, a été estimé en 2007 et 2008 sur les effluents liquides et solides de 4 types de filières (stockage, digestion aérobie, séparation mécanique et digestion aérobie de la fraction liquide du lisier suivie d'une décantation ou d'un pressage des boues).

La disparition progressive des teneurs en *E. coli* et en entérocoques traduit un impact modéré de chaque étape du traitement, qu'elle soit mécanique ou biologique.

Les concentrations moyennes observées dans les lisiers bruts en *E. coli* et en entérocoques, respectivement de 2×10^4 et $1,3 \times 10^4$ germes/g en 2008, sont très proches des valeurs observées en 2007 qui étaient de $4,7 \times 10^4$ *E. coli* /g et de $4,1 \times 10^4$ entérocoques /g. Ces données traduisent une stabilité de la charge bactérienne des lisiers bruts pour un élevage donné comme l'ont également observé Chinivasagam *et al.* (2004) qui ont suivi pendant 3 mois les concentrations en *E. coli* dans un effluent d'élevage.

Le stockage du lisier en fosse anaérobie ainsi que la digestion aérobie entraînent une diminution des teneurs en *E. coli* et en entérocoques de 1 à $2 \log_{10}$. Le stockage final des boues a un impact plus faible sur les concentrations en germes avec un abattement qui ne dépasse pas $0,8 \log_{10}$. Il a été rapporté des abattements de *E. coli* de 1,6 à $4,2 \log_{10}$ après 20 jours de digestion anaérobie psychrophile de lisiers (Côté *et al.*, 2006b) et des abattements de coliformes fécaux de $4,4 \log_{10}$ dans

les boues biologiques d'un pilote de nitrification / dénitrification (Vanotti *et al.*, 2004). Toutefois, ces données ont été obtenues en laboratoire et en système fermé. Il apparaît clairement que les systèmes ouverts à alimentation séquentielle tels qu'ils existent actuellement en Bretagne contribuent à maintenir un niveau élevé de germes entériques dans les sous-produits destinés à l'épandage malgré des durées de stockage pouvant atteindre 9 mois.

Les teneurs en germes indicateurs dans les deux fractions issues de la centrifugation sont comparables à celles du lisier brut. Légèrement plus élevées dans la fraction solide dont le taux de matières sèches est de 36%, les concentrations observées sont du même ordre de grandeur que celles rapportées par Placha *et al.* (2001) qui ont dénombré dans des refus de séparation entre 10^4 et 10^5 coliformes fécaux et entérocoques.

La filtration des boues entraîne une augmentation des concentrations en germes indicateurs dans la phase solide. Ce phénomène peut être expliqué par la nature des boues qui sont constituées de floccs possédant une forte capacité d'adsorption des micro-organismes. Celle-ci est d'ailleurs augmentée par l'addition de polymères qui améliore la compaction des boues.

4.2.2. Concentrations en *Salmonella* et prévalence de *L. monocytogenes* dans les effluents d'élevages porcins

Salmonella, bactérie pathogène couramment associée au porc, a été détectée à une fréquence relativement élevée de 59% dans les lisiers bruts. Comme pour les concentrations en germes indicateurs, les données concernant la prévalence de ce germe sont très dispersées. A titre d'exemple, les salmonelles ont été détectées à des fréquences de 1,6% (6/380) (Holzel et Bauer, 2008) et 7,9% (10/126) (Hutchison *et al.*, 2004a) dans les lisiers frais et à des fréquences de 5,2% (3/58) (Hutchison *et al.*, 2004), 31% (4/13), (Chinivasagam *et al.*, 2004), 39% (7/18) (Côté *et al.*, 2006a) et de 71,4% (10/14) (Watabe *et al.*, 2003) dans les lisiers stockés en fosse. Une étude menée par Fablet *et al.* (2006) en Bretagne à l'intérieur de 50 bâtiments d'élevage indique une prévalence des salmonelles de 12% dans le lisier stocké en pré-fosse, ce qui est plus faible que les données obtenues dans notre étude. La plupart des données de la littérature correspondent à des prévalences et il existe peu de données quantitatives sur les concentrations en salmonelles dans les lisiers. Les concentrations observées dans notre étude, toujours inférieures à 3 germes / g, sont plus faibles que celles rapportées dans la littérature. Ainsi Fablet *et al.* (2006) ont observé des concentrations de 2,4 à 350 bactéries / g de fèces et de 1,6 à 110 bactéries / mL de lisier frais. Hill et Sobsey (2003) ont dénombré entre 12 et 100 *Salmonelles* / mL de lisier brut. Vanotti *et al.* (2004) ont observé des valeurs plus élevées atteignant $7,7 \cdot 10^3$ salmonelles dans un lisier destiné à alimenter un pilote de traitement biologique. Les concentrations en *Salmonella* dépendent de nombreux facteurs dont l'état sanitaire des porcs, ce qui explique la variabilité des fréquences de détection de cette bactérie dans les différents élevages. Les facteurs ayant le plus d'influence sur la survie des salmonelles sont la température et la durée de stockage mais le pH et la concentration en NH_3 semblent aussi jouer un rôle sur la persistance de ce

germe (Hutchinson *et al.*, 2005a). Dans notre étude, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les paramètres physicochimiques mesurés, la concentration germes indicateurs de traitement et la présence de salmonelles. La détection de *Salmonella* dans 20% des boues stockées confirme les données de Hill et Sobsey (2003), Hutchinson *et al.* (2005), Vanotti *et al.* (2004) et Côté *et al.* (2006) qui ont également observé que les salmonelles étaient capables de résister au stockage ou au traitement biologique du lisier. Par ailleurs, toutes les études menées sur la survie de souches de salmonelles artificiellementensemencées dans du lisier de porcs, indiquent que la survie de ces bactéries dépasse en général 30 jours lorsque la température est inférieure à 26°C et que leur persistance est d'autant plus importante que la température est basse (Arrus *et al.*, 2006, Placha *et al.*, 2001, Nicholson *et al.*, 2005, Fablet *et al.*, 2006; Mannion *et al.*, 2007).

Les sérotypes des souches de *Salmonella* isolées des 10 lisiers dans lesquels ce germe a été détecté, correspondent majoritairement à *Salmonella* Derby (retrouvé dans 40% des lisiers analysés) et dans une moindre mesure à *S. Anatum*. Ces résultats confirment la prédominance du sérotype Derby, fréquemment retrouvé dans les élevages porcins (Corrége *et al.*, 2002, Watabe *et al.*, 2003; Fablet *et al.*, 2006).

La fréquence de détection de *L. monocytogenes* qui correspond à 29% des lisiers, est plus élevée que celle rapportée par Beloeil *et al.* (2003) qui ont détecté ce germe dans 15% des bâtiments d'élevage porcins. Leur présence dans 20% des boues reflète également leur capacité de résistance au cours du traitement. Toutefois, leur présence n'est pas corrélée à celle des salmonelles. Contrairement à ces dernières qui ont été largement étudiées, les données sur la survie de *L. monocytogenes* dans les lisiers sont rares et concernent le comportement de souches ensemencées artificiellement. Hutchison *et al.* (2005a) qui ont ensemencé *Salmonella* sp. et *L. monocytogenes* dans du lisier stocké ont observé un abattement similaire des deux germes, de l'ordre de 4 log₁₀ en 2 mois. Grewal *et al.* (2007) ont simulé plusieurs types de traitement (stockage du lisier liquide en anaérobiose et en aérobiose, compostage à 55°C et à 25°C) et ont suivi le comportement de deux souches de *S. Typhimurium* et de *L. monocytogenes*. Après 28 jours de stockage, les deux souches étaient mises en évidence dans les lisiers stockés à 25°C mais seule *L. monocytogenes* était encore détectée dans le lisier composté à 55°C. Bien qu'ils aient observés des différences de comportement entre les deux souches, les auteurs soulignent l'effet majeur de la température à 55°C sur l'élimination des deux germes pathogènes.

Enfin, il est important de souligner que les souches de *L. monocytogenes* isolées des différents élevages appartiennent aux sérotypes 1/2a, 4b et 4e dont 2 (1/2a et 4b) sont fréquemment impliqués dans les cas de listériose humaine (Farber et Peterkin, 1991).

4.3. Analyses moléculaires des communautés microbiennes des effluents

Il n'existe à ce jour que très peu d'études de microbiologie moléculaire sur la caractérisation des lisiers et des effluents d'élevage en général (Leung et Topp, 2001 ; Whitehead et Cotta, 2001 ; Cotta *et al.*, 2003 ; Chachkhiani *et al.*, 2004 ; Ziemer *et al.*, 2004 ; Snell-Castro R., 2004 ; Snell-Castro

et al., 2005 ; *Peu et al.*, 2006). Ceux-ci sont en effet souvent assimilés à la flore fécale animale. Pourtant les conditions environnementales de stockage et de traitement des déjections animales sont très différentes de celles des tubes digestifs animaux. Il semble alors évident que cette flore évolue pour s'adapter à son nouvel écosystème qui, selon l'intérêt du traitement appliqué, vise à éliminer les pathogènes, éliminer l'azote ou produire du biogaz.

Dans cette étude notre objectif était d'utiliser les outils de biologie moléculaire pour suivre l'évolution des effluents des élevages porcins et tenter de détecter sans *a priori* la persistance de groupes microbiens dominants du lisier au travers des filières de traitement développées pour éliminer l'azote et le phosphore.

La technique de PCR-SSCP permet d'obtenir des profils des communautés microbiennes de n'importe quel type d'échantillon biologique. Nous avons fait l'hypothèse que cette approche permettrait d'identifier rapidement des populations microbiennes dominantes dans les lisiers et de les suivre au travers des filières. Les points positifs de cette approche ont été la possibilité de produire rapidement et de manière automatisable un grand nombre de profils d'ADN. La limitation, qui est rapidement apparue, a été l'analyse des profils et surtout la difficulté à quantifier la "ressemblance" entre les profils. Nous avons jusqu'alors travaillé essentiellement de manière qualitative et par analyse visuelle. C'est pourquoi nous avons été conduits à utiliser le logiciel Safum et à produire son extension Safus. Au fur et à mesure de l'analyse de nos profils, nous avons pu valider cet outil en comparant les conclusions obtenues traditionnellement par alignement des profils avec les résultats générés par Safus de manière statistique.

Les résultats obtenus montrent une forte homogénéité des profils de Bactéries totales obtenus sur les lisiers bruts et les lisiers stockés en fosse. En effet, même si des différences existent d'un élevage à l'autre, tous les profils de Bactéries totales présentent des proportions similaires au niveau des groupes dominants de *Clostridium*, de *Bacteroides* et de bactéries lactiques. De plus, 4 pics dominants sont présents dans la majorité des profils de lisier brut. Ils ont été affiliés à un *Clostridiaceae* isolé à partir de sédiments (pic 1) et trois *Bacteroidales* observés dans un rumen (pic 2), un sol rhizosphérique (pic 3) et un digesteur anaérobie (pic 4). Cependant, les essais réalisés pour quantifier la survie des populations microbiennes correspondant aux pics 2 et 4 par FISH se sont révélés infructueux. L'hypothèse la plus simple est que ces populations sont présentes en dessous du seuil de détection de la méthode.

Concernant l'impact des systèmes de traitement sur la communauté microbienne du lisier, les résultats obtenus démontrent un impact important du traitement aérobie. En effet, les profils SSCP des Bactéries totales obtenus pour les lisiers bruts et les lisiers stockés en fosse correspondent à des temps de stockage allant de 1 à 9 mois. Leur grande similarité montre un faible impact du simple stockage anaérobie sur la communauté microbienne dominante du lisier. Les étapes de séparation de phase mécanique des lisiers (décanteur centrifuge) ou des boues (décanteur, filtre à bande) n'ont pas d'impact

sur la structure de la communauté microbienne. Cette observation est logique car ces systèmes ne sont pas sélectifs vis-à-vis des différentes populations microbiennes du lisier ou des boues. Leur impact est donc quantitatif et non qualitatif. Une légère différence est observée entre les phases liquide et solide du décanteur qui peut être liée à la présence d'espèces à dominance planctonique par rapport à celles attachées aux floccs. En revanche, les effluents obtenus après passage du lisier brut au travers des systèmes de traitement aérobies présentent des profils très différents, quel que soit le type de traitements 2, 3 ou 4. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Leung et Topp (2001) qui ont comparé l'évolution de la communauté microbienne d'un même lisier porcin par technique moléculaire dans deux réacteurs de laboratoire conduits en aérobiose et en anaérobiose. L'évolution de la communauté microbienne du lisier débute dans le bassin d'aération mais les changements les plus marqués surviennent principalement pendant le stockage séparé des effluents sous la forme de refus de séparation, de boues et d'eau de lagune. Il semblerait donc que l'impact des filières de traitement sur la communauté résulte d'une combinaison de changements de paramètres environnementaux (oxygène, pH, température, nutriments), d'activité microbienne (boue aérobie, boue anaérobie, lagunage) et du temps de stockage. Cette observation est logique puisque l'aération du lisier doit entraîner la disparition des groupes microbiens anaérobies stricts et favoriser l'installation des groupes aérobies ou anaérobies facultatifs. Elle pourrait s'expliquer par le fait que la communauté microbienne du lisier est dominée par des bactéries de la flore digestive du porc, principalement anaérobie. Lors du traitement aérobie, l'équilibre de cette flore serait rompu, et d'autres bactéries prendraient l'avantage et supplanteraient celles de l'appareil digestif porcin. Ces changements importants sont clairement visibles au niveau de la persistance des populations dominantes des lisiers bruts au travers des différents types de traitement. Les quatre pics majoritaires observés dans plus de 80 % des lisiers bruts frais ou stockés ne persistent pas dans de telles proportions dans les effluents des procédés de traitement aérobie.

Même si les perspectives ouvertes par cette approche sont encore floues, la capacité à pouvoir produire, analyser et quantifier l'évolution des communautés d'un grand nombre d'échantillons est une recherche actuelle importante dans le domaine de l'écologie microbienne (Dunbar *et al.*, 2001 ; Dollhopf *et al.*, 2001 ; Ramette A., 2007 ; Talbot *et al.*, 2008). Les applications les plus directes de cette approche sont la comparaison de filières et l'identification d'échantillons inconnus. Dans le premier cas, nous pouvons imaginer appliquer cette approche sur une chaîne de processus industriel (production et distribution d'eau potable, d'air, ou d'aliments par exemple). La réalisation de profils SSCP aux différentes étapes de la chaîne (supposée étanche) pourrait permettre de vérifier la qualité microbiologique du produit et la présence de "fuites" introduisant une variation dans le système. Dans le second cas, nous pouvons imaginer, à l'inverse, être capables d'identifier l'origine d'un prélèvement par comparaison avec des profils connus et répertoriés. Dans le cas de notre étude, même si les résultats ne sont pas aussi tranchés qu'il faudrait, il semble possible de différencier en aveugle les

échantillons de refus solides, de ceux du groupe lisiers + boues. Les échantillons de lagune en revanche sont trop dispersés.

5. CONCLUSION

Les communautés microbiennes des lisiers et des effluents de 17 élevages ont été analysées selon deux approches de microbiologie, une culturale et une moléculaire. Ces approches utilisent des outils très différents qui donnent des informations complémentaires (dénombrements des indicateurs et pathogènes / profils SSCP de la diversité microbienne). L'approche culturale classique permet d'accéder aux groupes microbiens sous-dominants et à un dénombrement des bactéries indicatrices et pathogènes. Elle permet de calculer un abattement sur les filières considérées. L'approche moléculaire permet la mise en évidence de micro-organismes dominants qui persistent au travers des filières de traitement des déjections sans avoir *d'a priori* sur leur identité et indépendamment de notre capacité à les cultiver. Cependant, comparée à l'approche culturale, cette approche n'est pas quantitative et elle ne permet de visualiser que les populations microbiennes très dominantes dans l'écosystème (de l'ordre du %).

Les deux approches se rejoignent dans leurs conclusions qui montrent que les traitements appliqués aux effluents d'élevages porcins, initialement mis en place pour éliminer l'azote et le phosphore, permettent un abattement de la charge bactérienne beaucoup plus fort que le traditionnel stockage en fosse des lisiers. Cet abattement est très important lorsque les filières se terminent par un compostage et un lagunage des phases solides et liquides du lisier traité, respectivement. Il n'est toutefois pas suffisant pour obtenir une hygiénisation complète des produits. Il existe donc un danger potentiel de dissémination de micro-organismes pathogènes dans l'environnement.

Plus en détail les résultats majeurs de l'étude sont :

- une variabilité des concentrations en germes indicateurs dans les lisiers bruts. Cette variabilité ne transparait pas dans les profils moléculaires des communautés microbiennes totales des lisiers qui visualisent les populations dominantes et qui paraissent plutôt stables.
- un impact limité du stockage en fosse des lisiers, indépendant de la durée de stockage qui se traduit en approche culturale par : (1) un faible abattement du nombre de germes avec le temps de stockage, (2) une stabilité des concentrations d'une année à l'autre pour un élevage donné. Cet impact limité est aussi observé en approche moléculaire avec une faible évolution des profils des communautés microbiennes pendant le stockage et la présence systématique de populations dominantes apparemment communes aux lisiers bruts et aux lisiers stockés.
- un effet inhibiteur des quatre filières de traitement sur l'ensemble des germes cultivés qui se traduit au niveau de l'approche moléculaire par des changements importants des profils moléculaires des communautés microbiennes et la disparition de la majorité des populations dominantes des lisiers bruts et stockés.

- la présence dans les lisiers et leurs sous-produits destinés à l'épandage de germes pathogènes présentant des sérotypes impliqués dans les toxi-infections alimentaires (*Salmonella* Typhimurium, Infantis, Hadar et *L. monocytogenes* 1/2a, 4b et 4e). A noter que l'approche moléculaire suggère aussi la présence de populations dominantes du lisier qui persistent au travers des filières. Cependant leur identification montre qu'elles appartiennent à des groupes de *Clostridium* et de *Bacteroidales* non pathogènes.
- une différence de survie des trois germes indicateurs au cours des traitements, qui n'a été recherchée que par l'approche culturale.
- une impossibilité dans le cette étude de quantifier par technique FISH la survie de deux populations dominantes des lisiers au travers des filières de traitement.

Si les traitements biologiques et physiques appliqués au lisier entraînent bien un abattement des *E. coli* et des entérocoques, ils ne sont cependant pas suffisants pour éliminer totalement les salmonelles et *L. monocytogenes* ce qui implique l'existence d'un danger potentiel de dissémination des germes pathogènes. Cependant, il serait intéressant de mesurer le bruit de fond de ces germes dans l'environnement, surtout pour *L. monocytogenes* qui semble relativement ubiquiste, de manière à mieux évaluer le danger que représente cette contamination.

Au regard des résultats obtenus dans cette étude qui montrent clairement que l'apport continu de lisier dans les fosses de stockage augmente le risque sanitaire et en s'appuyant sur les données bibliographiques qui soulignent toutes l'influence majeure de la température et de la durée de stockage, il apparaît important de proposer des solutions techniques permettant de diminuer les concentrations en germes entériques. S'il n'est pas envisageable à un coût raisonnable de réguler la température, il est en revanche possible de modifier le système d'alimentation séquentielle des fosses de stockage. Cela nécessite l'utilisation d'une fosse supplémentaire qui serait remplie en une seule fois et dans laquelle le lisier ou les boues issues du traitement seraient stockées plusieurs mois entre chaque période d'épandage. Cette proposition avait déjà été formulée par Bisailon *et al.* en 1984.

BIBLIOGRAPHIE

- Amann R.I., Krumholz L. and Stahl D.A. (1990) 'Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology', J. Bacteriol. 172, 762-770.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Rev. 59, 143-169.
- Anonyme (1999). V08-056. Microbiologie alimentaire - Dénombrement des *Clostridium perfringens* par comptage des colonies à 37 degrés Celsius - Méthode de routine. 14 pages. AFNOR, France.
- Anonyme (2004). XP X33-018. Caractérisation des boues - Dénombrement des *Salmonella* - Méthode de dénombrement en milieu liquide (méthode du Nombre le Plus Probable - NPP). 20 pages. AFNOR, France
- Arrus K. M., Holley R. A., Ominski K. H., Tenuta M., Blank G. (2006). Influence of temperature on *Salmonella* survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs. Livestock Science. 102, (3) : 226-236
- Belœil P. A., Fravalo P., Chauvin C., Fablet C., Salvat G., Madec F. (2003). *Listeria* spp. contamination in piggeries: comparison of three sites of environmental swabbing for detection and risk factor hypothesis. 1: Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health. 2003 50(4):155-60
- Bisaillon, J. G., R. Beaudet, M. Sylvestre, M. Ishaque, A. Morin, E. Di Franco, and A. M. Guérin. (1984). Aspects microbiologiques du lisier de porc. Sciences et Techniques de l'Eau 17:397-400.
- Bohnert, M., F. Dilasser, C. Dalet, J. Mengaud, and P. Cossart ; (1992) ; "Use of Specific Oligonucleotides for Direct Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Food Samples by Colony Hybridization and Rapid Detection by PCR." Research in Microbiology 143:271-280.
- Bornay-Llinares F. J., Navarro-i-Martinez L., Garcia-Orenes F., Araez H., Pérez-Murcia M. D., Moral R. ; (2006) ; "Detection of intestinal parasites in pig slurry : a preliminary study from five farms in Spain" ; Livestock Sciences 102 (2006) 237-242
- Chachkhiani, M., P. Dabert, T. Abzianidze, G. Partskhaladze, L. Tsiklauri, T. Dudaoui, and J. J. Godon. (2004). 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. Bioresource Technol. 93:227-232.
- Chinivasagam, H. N., R. J. Thomas, K. Casey, E. McGahan, E. A. Gardner, M. Rafiee, and P. J. Blackall ; (2004). "Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in the south east Queensland region of Australia.". Journal of Applied Microbiology 97:883-891.
- Corrége I., Proux K., Fravalo P., Cornou C.1, Flého J.Y., (2002) Les salmonelles en élevage porcin : caractérisation et rôle épidémiologique du statut des cochettes. Journées Rech. Porcine. 34, 309-315
- Côté C., Villeneuve A., Lessard L., Quessy S. (2006a) Fate of pathogenic and nonpathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Quebec Livestock Science 102 (3): 204-21
- Côté C., Massé D. I., Quessy S. (2006b) Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. Bioresource Technology. 97 (4) :686-691
- Cotta, M.A., Whitehead, T.R., and Zeltwanger, R.L. (2003) Isolation, characterisation and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. Environ. Microbiol. 5(9),737-45.
- Dabert P., Delgenès J-P., Moletta R., Godon J-J. (2002) Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 1: 39-42.
- Delbès C., Moletta R., Godon J.J. (2001). Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. FEMS Microbiology Ecology, 35 : 19-26.

- Dollhopf SL, Hashsham SA & Tiedje JM (2001) Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: Application of self-organizing maps and principal components analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb Ecol* 42: 495-505.
- Dunbar J, Ticknor LO & Kuske CR (2001) Phylogenetic specificity 466 and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67:190-197.
- Fablet C., Robinault C., Jolly J.P, Collet M., Chemaly M., Labbé A, Madec F, Fravallo P. (2006). *Salmonella* Enterica level in French pig farms effluents: Experimental and field data *Livestock Science*. 102, (3) : 216-225
- Farber, J. M., Peterkin P. I., (1991) *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol. Reviews* 55:476-511.
- Gessel Peter D., Hansten Neil C., Goyal Sagar M., Johnston Lee J., Webb Judy ; (2004) ; "Persistence of zoonotic pathogens in surface soil treated with different rates of liquid pig manure" ; *Applied soil Ecology*. 25 (3) :181-276 45.
- Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* (1997) 63(7):2802-13.
- Grewal S.; Sreevatsan S.; Michel F. C. (2007) Persistence of *Listeria* and *Salmonella* during swine manure treatment. *Compost Science and Utilization*. 15 (1) : 53-62
- Guan Tiffany T.Y., Richard A. Holley. ; (2003) ; "Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness-A review." ; In *Hog Manure Management and Human Health*. 51-71.
- Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D.L., De Vos W. (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus* spp and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1) : 114-123.
- Hill, V.R. and Sobsey, M.D. (1998) Microbial indicator reductions in alternative treatment systems for swine wastewater. *Water Science and Technology* 38, 119–122.
- Hill, V. R., and Sobsey M. D. (2003) ; "Performance of swine waste lagoons for removing *Salmonella* and enteric microbial indicators" ; *Transactions of the ASAE* 46:781-788.
- Hölzel C.; Bauer J. (2008). *Salmonella* spp. in Bavarian liquid pig manure: Occurrence and relevance for the distribution of antibiotic resistance. *Zoonoses and Public Health*. 55 (3) :133-138(6)
- Hutchison ML, Walters LD, Moore A, Avery SM. (2005a). Declines of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm *Journal of Applied Microbiology* 99 (1): 58-65
- Hutchison ML, Walters LD, Avery SM, Moore A. (2005b) Decline of zoonotic agents in livestock waste and bedding heaps. *Journal of Applied Microbiology*. 99 (2) : 354-362
- Hutchison M.L., Walters L.D., Avery S.M., Syngé B.A., Moore A. (2004a) Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Letters in Applied Microbiology*. 39 (2) :207 - 214
- Hutchison ML, Walters LD, Moore A, Crookes KM, Avery SM. (2004b). Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (9) : 5111-5118
- Juteau P., Tremblay D., Ould-Moulaye C. B., Bisailon J. G., Beaudet R. ; (2004) ; Swine waste treatment by self heating aerobic thermophilic bioreactors. *Water Research*. 38, 539-546
- Leung, K., and E. Topp. (2001). Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. *Fems Microbiol. Ecol*. 38:169-177.
- Levasseur Pascal. (1998) Mieux connaître les lisiers de porc. Compositions, volumes et analyses. Edité par l'Institut Technique du Porc. IP 1999.

- Levasseur P. , Lemaire N. (2003). Etat des lieux du traitement des lisiers de porcs en France. *Techni porc*. 26(4) : 41-42
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès JP, Godon JJ. (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8(4):720-31.
- Loyon L., F. Béline, F. Guiziou, H. Boursier (2003) Bilan environnemental des procédés de traitement biologique des lisiers de porcs. Rapport Cemagref – Ademe contrat : 02 75 041.
- Mannion C.; Lynch P.B.; Egan J.; Leonard F.C. (2007). Seasonal effects on the survival characteristics of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in pig slurry during storage *Journal of Applied Microbiology*, 103, (5),) 1386-1392
- Martinez José et Le Bozec Gildas ; (2000) ; "Déjection porcines et problème environnementaux en Europe" ; *Cahier de l'agriculture* 2000 ; 9 : 181-190
- Nicholson Fiona A., Groves Simon J., Chambers Brian J. ; (2005) ; "Pathogen survival during livestock manure storage and following land application" ; *Bioresource Technology* 96 :135-143
- Placha I., Venglovsky J., Sasakova N., Svoboda I. F., (2001). The effect of summer and winter seasons on the survival of *Salmonella* Typhimurium and indicator micro-organisms during the storage of solid fraction of pig slurry . *J. of Appl. Microbiol.*. 91 (6) : 1036-1043
- Payment, P. et P. Hartemann (1998) Les contaminants de l'eau et leurs effets sur la santé. *Rev. des Sciences de l'Eau*, 11, 199-210.
- Peu, P., F. Beline, and J. Martinez. 2004. Volatile fatty acids analysis from pig slurry using high-performance liquid chromatography. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 84:1017-1022.
- Peu P, Brugere H, Pourcher AM, Kerouredan M, Godon JJ , Delgenes JP, Dabert P. (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management *Appl Environ Microbiol*, 72(5) : 3578-85
- Pourcher A.M., Morand P., Picard-Bonnaud F., Billaudel S. , Montpoehe S., Federighi M., Ferré V., G. Moguedet. (2005). Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in mixture with straw. *Journal of Applied Microbiology* 99 (3) : 528-539
- Pourcher A.M., Picard-Bonnaud F., Ferré V., Gosinska A., Stan V., Moguedet G. (2007) Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Applied Soil Ecology* 35, pages 473–479.
- Rice, E.W., K.R. Fox, R.J. Miltner, D.A. Lytle and C.H. Johnson. (1996) Evaluating Plant Performance With Endospores. *J. Amer. Water Works Ass.* 88: 122-130.
- Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 142-160.
- Rufete B., Perez-Murcia M.D., Perez-Espinosa A., Moral, R., Moreno-Caselles J., Paredesa C. (2006). Total and faecal coliform bacteria persistence in a pig slurry amended soil. *Livestock Science*. 102, (3) : 211-215
- Snell-Castro R., (2004), Caractérisation de la communauté microbienne de lisier et de fumiers de porcs par des méthodes moléculaires. Thèse de sciences des aliments : Université de Montpellier II, 254 pages.
- Snell-Castro R., J-P Delgenès, J-J Godon, P Dabert ; (2005) ; "Characterization of the microbial small rDNA diversity in pig manure storage pit." ; *FEMS Microbiology Ecology*. 52: 229-242.
- Talbot G, Topp E, Palin MF & Massé DI (2008) Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Res* 42: 513-537.
- Toranzos, G.A., G.A. McFeters, and J.J. Burrego. (1997) Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. Pp. 184-194.

- Turner. C. (2002) The thermal inactivation of *E. coli* in straw and pig manure. *Bioresource Technology*.84 (1):57-61.Links
- Van Dyke, M. I., and A. J. McCarthy. (2002). Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2049-2053.
- Vanotti, Matias B., Patricia D. Millner, Patrick G. Hunt, April Q. Ellison. ; (2005) ; "Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment." ; *Bioresource Technology* 96:209-214.
- Watabe, M., Rao J. R., Stewart T. A., Xu J., Millar B. C., Xiao L., Lowery C. J., Dooley J. S. G., Moore J. E., (2003) Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated and unseparated stored pig slurry. *Letters in Appl. Microbiol.* 36:208-212.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Whitehead, T. R., and M. A. Cotta. (2001). Characterisation and comparison of microbial populations in swine faeces and manure storage pits by 16S rDNA gene sequence analyses. *Anaerobe* 7:181-187.
- Wood, J., K. P. Scott, G. Avgustin, C. J. Newbold, and H. J. Flint. (1998). Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides* and *Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3683-3689.
- Zemb, O., Haegeman B., Delgenes JP., Lebaron P., Godon J.J. (2007) safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators *Molecular Ecology Notes* Volume 7 Issue 5, Pages 717 - 898
- Ziemer, C. J., M. A. Cotta, and T. R. Whitehead. (2004). Application of group specific amplified rDNA restriction analysis to characterize swine fecal and manure storage pit samples. *Anaerobe* 10:217-227.

PUBLICATIONS ET RAPPORTS LIES AUX TRAVAUX EFFECTUES

Revues scientifiques et techniques à comité de lecture

Martinez J., Dabert P., Barrington S. Livestock waste treatment systems of the future: A challenge to environmental quality, food safety, and sustainability. *Accepté, révisions mineures dans Bioresource Technology*

Béline, F., Daumer, M.L., Loyon, L., Pourcher, A.M., Dabert, P., Guiziou, F., Peu, P. - 2008. The efficiency of biological aerobic treatment of piggery wastewater to control nitrogen, phosphorus, pathogen and gas emissions. *Water Science and Technology*, vol. 57, n° 12, p. 1909 – 1914

Revues scientifiques et techniques sans comité de lecture

Dabert P., Pourcher A.M., Peu P., Brugère H., Godon J.J. Évaluation de la survie de la flore fécale porcine au travers des filières de gestion des lisiers. *accepté pour publication dans l'ouvrage Maladies émergentes, éditions Quae.* (auteur)

Communications dans des congrès, symposium

Communications orales

Pourcher A.M., Fravallo P., Dabert P. (2008) Impact du traitement biologique du lisier de porcs sur les germes d'intérêt sanitaire : exemple de 17 élevages bretons. 5 et 6 février 2008. 40^{èmes} Journées de la Recherche Porcine Paris. Vol40, p.19-24.

Pourcher A.M., Marti R., Thorigné A., Jegou B., Dabert P. (2007) effect of anaerobic storage and aerobic digestion on the micro-organisms of in pig manure: cultural and molecular approaches. xiii congrès international de l'international society for animal hygiene, Tartu (Estonie), 17 au 21 juin 2007. p 926-932.

Béline, F., Daumer, M.L., Loyon, L., Pourcher, A.M., Dabert, P., Guiziou, F., Peu, P. - 2008. The efficiency of biological aerobic treatment of piggery wastewater to control nitrogen, phosphorus, pathogen and gas emissions. 8th Specialised Conference on Small Water and Wastewater Systems, Coimbatore, IND, 6-9 February 2008. 7 p.

Affiches

Dabert P., Pourcher A.M., Marti R., Jégou B., Thorigné A., Martinez J. (2007) Effet des traitements biologiques sur la flore du lisier de porc : impact sanitaire et suivi moléculaire. VII^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie, Nantes, 30 mai au 1er juin 2007. 1p.

Mémoires de stages

Bocquel M. (2008) Analyse statistique de profils microbiens : Développement du logiciel SAFUS - Étude des filières de traitement biologique du lisier. Stage d'Ingénieur en Informatique (4ème année) de l'INSA de Rennes

Cousin F. (2007) Suivi moléculaire des micro-organismes du lisier de porc au travers des filières de traitement. Master 1 BCGMP parcours microbiologie, UFR Sciences de la vie et de l'environnement, Université de Rennes 1

Besson E. (2007) Développement d'un logiciel d'analyse des profils de communautés microbiennes obtenus par électrophorèse capillaire SSCP. Stage d'Ingénieur en Informatique (4ème année) de l'INSA de Rennes

Thorigné, A. - 2006. Impact sanitaire des traitements des lisiers de porcs : suivi des germes indicateurs de contamination fécale et de deux germes pathogènes. Master 1 Biologie parcours Microbiologie Université de Rennes 1 UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement. 32 p.

Boutin, F. - 2008. Etude de l'évolution des concentrations en germes d'intérêt sanitaire au cours du traitement du lisier. DUT Département génie biologique, IUT Laval. 29 p.

Jégou, B.L. - 2006. Etude de l'impact sanitaire des traitements biologiques des lisiers de porcs par des méthodes culturales et moléculaires . Master MUM, Agrocampus Rennes. 88 p.

ANNEXE 1

Caractéristiques physico-chimiques des 40 prélèvements étudiés en 2006

Type d'élevage	Code d'élevage	Prélèvement	Temps de stockage du lisier (mois)	pH	T°C	MS en %	NTK gN/L	NH4+ gN/L	DCO totale gO ₂ /L	DCO soluble gO ₂ /L	AGV totaux g/L
0	B	lisier brut stocké	12	8	6,7	3,1	3,6	2,7	34,5	10,6	3,0
0	C	lisier brut stocké	> 6	7,7	9	5,0	5,5	4,0	61,6	11,3	1,8
0	D	lisier brut stocké	10	7,8	8	3,6	3,2	2,2	44,1	ND	0,6
0	E	lisier brut stocké	< 3 (frais)	7,4	11	4,5	4,7	3,1	66,1	ND	8,8
0	G	lisier brut stocké	6 à 9	7,5	10	5,8	4,2	2,9	64,9	6,7	0,0
moyenne				7,7	8,9	4,4	4,2	3,0	54,2	9,5	2,8
1	H	lisier frais	1 à 2	7,6	10	4,9	4,3	3,1	59,6	10,4	2,2
1	I	lisier frais	1 à 2	7,7	12	2,4	3,2	2,6	31,4	4,5	0,9
1	O	lisier frais	< 1	7,8	15	2,0	3,0	2,5	13,6	4,3	0,1
1	P	lisier frais	< 1	7,7	19,6	4,1	4,6	3,2	58,0	11,6	1,4
2	F	lisier frais	< 1	7,9	11	4,3	3,9	2,6	39,4	5,9	0,6
2	J	lisier frais	1	7,9	13	5,1	4,2	2,7	82,9	10,1	2,5
2	L	lisier frais	< 1	7,9	15	6,0	5,8	4,2	16,0	16,0	5,8
3	K	lisier frais	< 1	7,6	ND	4,0	4,4	2,8	37,7	9,3	2,5
3	M	lisier frais	frais	7,9	15	4,1	4,1	3,2	37,0	7,8	5,9
3	N	lisier frais	1 à 2	7,8	16	6,1	5,6	3,7	81,1	17,1	5,0
4	Q	lisier frais	< 1	7,8	21	5,0	4,4	3,0	50,2	8,5	1,4
4	R	lisier frais	< 1	ND	ND	6,0	4,0	2,2	67,5	7,7	0,7
moyenne				7,8	14,8	4,5	4,3	3,0	47,9	9,4	2,4
1	H	boues stockées	6 à 7	7,5	10	4,0	1,5	0,3	35,8	3,4	0,3
1	I	boues stockées	6 à 8	7,6	10	2,8	1,1	0,5	27,5	2,1	0,1
1	O	boues stockées	3	8,2	15	1,9	0,9	0,3	14,4	1,5	ND
1	P	boues stockées	ND	7,3	19,6	4,0	1,6	0,2	38,9	1,8	ND
2	F	boues stockées	> 6	7,3	6	9,1	2,7	0,4	73,5	3,2	ND
2	J	boues stockées	8 à 9	7,2	11	9,0	3,0	0,5	40,0	3,1	0,2
2	L	boues stockées	6 à 7	7,1	14	6,8	2,7	0,7	70,6	3,0	0,4
3	K	boues stockées	> 6	7,4	ND	5,8	2,3	0,3	35,3	1,9	0,2
3	M	boues stockées	> 6	7,7	13,5	5,4	2,8	0,8	47,5	2,4	1,0
3	N	boues stockées	1	7,9	16	2,3	1,2	0,1	23,1	2,0	0,0
moyenne				7,5	12,8	5,1	2,0	0,4	40,7	2,4	0,3
2	F	lagune	> 6	9,1	ND	0,8	0,1	0,0	2,1		
2	J	lagune	> 6	9,1	22	0,8	0,1	0,0	3,2		
2	L	lagune	> 6	9,3	ND	0,8	0,1	0,0	3,0		
3	K	lagune	> 6	9,5	22	0,7	0,1	0,0	2,1		
3	M	lagune	> 6	8,9	21	0,7	0,1	0,0	1,4		
3	N	lagune	> 6	9,4	ND	0,8	0,1	0,0	2,4		
4	Q	lagune	> 6	9,4	26	0,7	0,1	0,0	1,1		
4	R	lagune	> 6	9,6	21	0,6	0,0	0,0	0,0		
moyenne				9,3	22,4	0,7	0,1	0,0	1,9		
3	K	refus séparation	> 3	ND	ND	44,0	17,3	7,2			
3	M	refus séparation	> 3	ND	ND	35,1	15,9	6,2	99,0		
3	N	refus séparation	> 3	ND	ND	36,5	17,3	6,6	216,0		
4	Q	refus séparation	< 3	ND	ND	39,8	9,9	3,4	352,0		
4	R	refus séparation	< 3	ND	ND	24,7	7,5	0,7	437,1		
moyenne				ND	ND	13,3	4,9	1,7	86,3		

ND : Non Déterminé

ANNEXE 2

Caractéristiques physico-chimiques des 22 prélèvements étudiés en 2007

Type d'élevage	Code d'élevage	Prélèvement	Temps de stockage du lisier (mois)	pH	T °C	MS en %	NTK gN/L	NH4+ gN/L	DCO totale gO ₂ /L	DCO soluble gO ₂ /L	AGV totaux g/L
0	B	lisier brut stocké	12	7,65	11	4,6	4,6	3,0	61,0	20,2	9,6
moyenne				7,7	11,0	4,6	4,6	3,0	61,0	20,2	9,6
0	B	lisier frais	< 1	7,35	11	9,4	5,4	2,9	84,1	15,5	8,9
2	F	lisier frais	< 1	7,9	16	5,4	4,5	2,9	51,1	7,7	1,8
3	K	lisier frais	< 1	7,72		4,6	4,1	2,6	51,0	8,1	2,3
4	R	lisier frais	< 1	7,32	15,5	5,22	4,1	2,6	32,8	18,8	5,1
moyenne				7,6	14,2	6,2	4,5	2,7	54,8	12,5	4,5
2	F	boues activées	< 1	7,89	15	4,8	1,4	0,2	6,0	2,9	0,1
3	K	boues activées	< 1	8,13		2,0	3,9	0,0	19,1	2,0	ND
4	R	boues activées	< 1	8,01	24	1,84	0,7	0,1	12,3	0,7	0,0
moyenne				8,0	19,5	2,9	2,0	0,1	12,5	1,9	0,0
3	K	Sortie centri liquide		8,0		1,9	3,6	2,5	23,3	0,9	2,3
4	R	Sortie centri liquide		7,5	15,0	3,3	4,2	2,7	43,1	13,3	ND
moyenne				7,7	15,0	2,6	3,9	2,6	33,2	7,1	2,3
3	K	Sortie centri solide				35,8	13,7	4,1	89,1	NR	ND
4	R	Sortie centri solide				32,2	NR	NR	NR	NR	ND
moyenne						34,0	13,7	4,1	89,1		
2	F	boues liquide	< 6	7,88	16	1,2	0,2	0,0	6,6	NR	ND
2	F	boues solides	< 6	7,25	13	7,4	2,4	0,3	65,7	ND	0,1
4	R	Sortie presse liquide		8,42	20	0,64	0,07	0,02	0,2	ND	ND
4	R	Sortie presse solide		ND	ND	14,27	7,9	0,1	54,2	NR	ND
2	F	boues stockées	> 12	7,18	15	10,3	2,1	0,3	5,1	2,5	0,07
3	K	boues stockées	> 6	ND	ND	5,88	2,2	0,3	50,0	2,2	0,04
moyenne				7,2	15,0	8,1	2,1	0,3	27,6	2,4	0,06
2	F	lagune	> 6	8,76	15	0,8	0,3	ND	2,6	1,7	0,03
3	K	lagune	> 6	8,81		0,5	0,2	ND	2,1	NR	ND
4	R	lagune	> 6	8,89	15	0,4	0,1	ND	9,2	0,5	ND
moyenne				8,8	15,0	0,6	0,2		4,6	1,1	0,03
3	K	refus séparation stocké	> 3	ND		35,9	17,1	6,4	400,7	ND	ND

NR : non réalisé ou non réalisable

ND : non détecté

ANNEXE 3

Caractéristiques physico-chimiques des 22 prélèvements étudiés en 2008

Type d'élevage	Code d'élevage	Prélèvement	Temps de stockage du lisier (mois)	pH	T°C	MS en %	NTK gN/L	NH4+ gN/L	DCO totale gO ₂ /L	DCO soluble gO ₂ /L	AGV totaux g/L
0	B	lisier brut stocké	12	7,5		1,9	3,2	2,6	23,0	14,3	6,5
			moyenne	7,5		1,9	3,2	2,6	23,0	14,3	6,5
0	B	lisier frais	< 1	7		8,6	5,9	3,6	96,0	26,3	6,7
2	F	lisier frais	< 1	7,85	NR	4,6	4,3	2,9	50,8	NR	0,1
	K	lisier frais	< 1	7,76	16	2,5	3,2	2,1	26,9	6,8	3,1
4	R	lisier frais	< 1	8	17	4	3,7	2,4	42,0	13,7	3,8
			moyenne	7,7	16,5	4,9	4,3	2,7	53,9	15,6	3,4
2	F	boues activées	< 1	7,93	NR	4,9	1,5	0,2	47,0	3,3	ND
3	K	boues activées	< 1	7,92	14	1,9	0,9	0,1	15,1	1,6	ND
4	R	boues activées	< 1	8,39	33	2,5	0,8	0,1	12,5	0,6	ND
			moyenne	8,1	23,5	3,1	1,1	0,1	24,8	1,8	ND
3	K	Sortie centri liquide		7,95	18,0	1,6	2,7	2,0	16,4	8,0	3,0
4	R	Sortie centri liquide		7,8	17,0	3,2	3,5	2,4	31,4	NR	1,0
			moyenne	7,9	17,5	2,4	3,1	2,2	23,9	8,0	2,0
3	K	Sortie centri solide		NA	18,0	28,9	10,0	3,4	317,7	NA	NA
4	R	Sortie centri solide		NA	NR	35,8	8,9	2,8	482,7	NA	NA
			moyenne			32,4	9,4	3,1	400,2		
2	F	boues liquide	< 6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2	F	boues solides	< 6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	R	Sortie presse liquide		8,48	18	0,9	0,14	0,02	3,83	1,26	NR
4	R	Sortie presse solide		NA	NR	16,6	5,8	0,1	97,7	NA	NA
2	F	boues stockées	> 12	7,14	13,9	9,8	3,0	0,5	22,5	3,5	ND
3	K	boues stockées	> 6	10		3,1	1,8	0,2	38,0	1,9	ND
			moyenne	8,6	13,9	6,5	2,4	0,3	30,2	2,7	
2	F	lagune	> 6	8,39	12	0,8	0,1	0,0	2,5	1,7	
3	K	lagune	> 6	8,7	11	1,6	0,2	0,0	1,5	NR	
4	R	lagune	> 6	9,49	NR	0,7	0,0	0,0	0,8	0,6	ND
			moyenne	8,9	11,5	1,0	0,1		1,6	1,2	
3	K	refus séparation stocké	> 3	NA	NR	35,6	13,3	4,9	277,6	NA	

NR : non réalisé ou non réalisable

ND : non détecté

NA : non applicable

ANNEXE 4

Protocole PCR pour la recherche du gène *hlyA*

Une suspension dense de bactéries est réalisée dans de l'eau distillée stérile, à partir d'un isolement sur milieu non sélectif incubé 24 heures à 37°C.

Une extraction de l'ADN est réalisée selon le protocole suivant : centrifugation de 1 mL de la suspension à 5000 g pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot bactérien est repris dans 1 mL de Tampon PBS-Tween (NaCl 8g/L ; KCl 0,2g/L ; Na₂HPO₄ 1,44g/L ; KH₂PO₄ 0,24g/L ; 0,05% Tween 80 (p/v)) et les cellules sont lysées par une incubation à 100°C pendant 5 minutes. Le lysat est centrifugé à 12 000 g pendant 5 minutes, puis le surnageant est récupéré dans des tubes propres.

Les amorces DO (5'-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3') et GO (5'-GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG-3') ont été utilisées pour cibler le gène *hlyA*. L'amplification a été effectuée par la *RedTaq* polymérase (Stratagene). Le mélange réactionnel est le suivant : 5µL de tampon 10X *RedTaq* ; 0,20 mM de dNTP ; 2,87 ng.µL⁻¹ d'amorce DO et 3,76 ng.µL⁻¹ d'amorce GO ; 0,1 unité de *RedTaq* polymérase ; complété à 49 µL par de l'eau ppi (Aguetan), auquel 1µL d'ADN total est ajouté. Les conditions de réaction sont : 5 minutes de dénaturation initiale à 94°C, suivies de 35 cycles comprenant 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation à 65°C et 1 minute d'élongation à 72°C. La PCR se termine par une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

La taille des produits de PCR (400 pb) a été vérifiée par électrophorèse en déposant 10 % du produit de réaction sur un gel d'agarose à 2% avec un marqueur de taille (100 pb ladder Promega).

Protocole de FISH

Préparation de la solution d'hybridation

Nous travaillons à 20% de formamide pour l'ensemble des sondes, par défaut. La composition de la solution d'hybridation est la suivante :

- 180 μ L de NaCl 5 M
- 20 μ L de Tris HCl 1 M
- 200 μ L de formamide
- 600 μ L d'eau nanopure
- 2 μ L de SDS 10%

Préparation de la solution de rinçage

La composition de la solution de rinçage est la suivante :

- 1 mL de Tris HCl 1 M
- 2150 μ L de NaCl 5 M
- 2,5 mL d'EDTA 0,1 M
- QSP 50 mL d'eau nanopure
- 50 μ L de SDS 10%

Hybridation *in situ*

- Déposer 20 μ L d'échantillon dans chaque puits d'une lame de microscope.
- Placer la lame au minimum 30 min au four à 46°C pour sécher les échantillons.
- Placer la lame 3 min dans 3 bains d'éthanol successifs : éthanol 50%, 80% et 96%.
- Ajouter 10 μ L de solution d'hybridation dans chaque puits.
- Ajouter 1 μ L de chaque sonde dans chaque puits.
- Imbiber un morceau de papier absorbant avec le reste de la solution d'hybridation.
- Placer le papier et la lame dans un tube de 50 mL et fermer.
- Placer le tube au four à 46°C durant 1h30.
- Rincer la lame avec un peu de solution de rinçage.
- Placer la lame dans le tube de solution de rinçage et déposer l'ensemble dans le bain-marie à 48°C durant 10 min.
- Rincer la lame à l'eau et la sécher.
- Monter la lame avec une goutte de citifluor dans chaque puits et déposer une lamelle et la scotcher.

ANNEXE 6

Principe de la PCR

La PCR repose généralement sur une succession de 30 à 35 cycles, chacun composé de trois phases (cf. Figure 1):

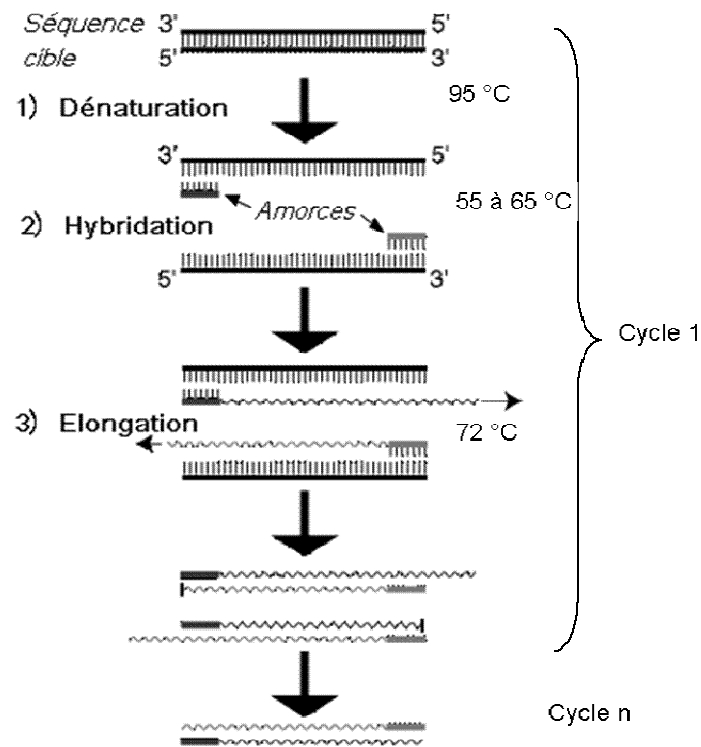


Figure 1 : schéma de principe de la PCR

- 1) **La dénaturation** : montée de la température à 94 ou 95°C afin de séparer les deux brins des ADN.
- 2) **L'hybridation** : la température est diminuée à une température généralement comprise entre 55 et 62°C. Elle permet l'hybridation des amorces. La valeur de la température est définie comme devant être 5°C inférieure à la celle du T_m des amorces (Température de demi dissociation) qui dépend de leur séquence.
- 3) **L'élongation** : La *Taq* polymérase reconnaît l'extrémité 3' de l'amorce et crée le brin complémentaire du brin auquel est fixée l'amorce. La température optimale de l'élongation est de 72°C. La durée de cette étape dépend de l'activité de l'enzyme et de la taille du fragment à amplifier.

A partir du 2^{ème} cycle d'amplification, on obtient des fragments double brins comprenant uniquement la séquence ciblée, délimitée par les séquences des amorces.

L'amplification est exponentielle c'est-à-dire qu'à chaque cycle, la quantité d'ADN amplifié est doublée. Après 35 cycles, on obtient ainsi plus de 34 milliards de fois le nombre de copies initiales.