



HAL
open science

Caractérisation de la communauté microbienne de lisier et de fumiers de porcs par des méthodes moléculaires

Raul Snell-Castro

► **To cite this version:**

Raul Snell-Castro. Caractérisation de la communauté microbienne de lisier et de fumiers de porcs par des méthodes moléculaires. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2004. Français. NNT: . tel-02828625

HAL Id: tel-02828625

<https://hal.inrae.fr/tel-02828625v1>

Submitted on 7 Jun 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.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Formation Doctorale : Sciences des procédés biologiques et industriels
Ecole Doctorale : Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement

par

SNELL-CASTRO Raúl

Le Vendredi 24 Septembre 2004

**Caractérisation de la communauté microbienne
de lisier et de fumiers de porcs par des méthodes moléculaires**

JURY

M. GUIRAUD Joseph,

Professeur des Universités, Université Montpellier II, **Président**

M. DABERT Patrick,

Chargé de Recherches, LBE/INRA Narbonne, **Directeur de Thèse**

M. THOLOZAN Jean-Luc,

Professeur des Universités, Université de Provence, Marseille, **Rapporteur**

M. SGHIR Abdelghani,

Professeur des Universités, Université d'Evry, **Rapporteur**

M. MARTINEZ José

Directeur de Recherches, Cemagref Rennes, **Examineur**

A mis Padres y mis hermanos

A mi Luna Josefina

A mis amigos

*A pasado solo un momento desde que el sueño desapareció
y el roble brinda su sombra acojedora a la viña florisante.
Un instante a transcurrido y una marejada de milagros y reflexiones crean el ritual
para decirle a la vida ambrienta que devoré al sueño.*

Remerciements

Ces travaux ont été menés au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne, dont je remercie le directeur **M. Jean-Philippe Delgenès** pour son accueil, sa gentillesse et son soutien pour ma formation académique.

Je tiens également à remercier les deux organismes qui ont soutenu financièrement cette thèse, le CONACyT du Mexique et le projet Porcherie Verte.

Je tiens à remercier à **M. Jean-Jaques Godon** pour m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse dans son équipe de biologie moléculaire et pour ses conseils tout au long de ce travail.

Je voudrai remercier le ex directeur **M. René Moletta** pour m'avoir proposer comme candidat pour faire un thèse dans ce laboratoire.

Je veux exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du jury **M. Joseph GUIRAUD, M. Jean-Luc THOLOZAN, M. Abdelghani SGHIR** et **M. José MARTINEZ**, pour avoir accepté de juger ce travail et pour ces recommandations.

Je tiens particulièrement à remercier **M. Patrick DABERT**, Chargé de Recherche à l'INRA de Narbonne, pour m'avoir encadré tout au long de la réalisation de cette étude et pour ses conseils sur l'orientation de mes recherches. Ainsi que pour son amitié ; cette thèse c'est à lui aussi.

J'adresse mes remerciements à **M. Hervé MACARIE** pour avoir examiné le chapitre 3 de ce manuscrit concernant à la digestion anaérobie.

Je remercie aussi vivement à **Mme. Véronique MAUGENET** pour la révision de l'orthographe et la grammaire de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier à **Nathalie Wery** et **Nicolas Rousselon** pour leur aide et conseils scientifiques sur la PCRq et aussi pour leur amitié.

Une pensée très chaleureuse accompagne tous les autres stagiaires, **Odile, Alice, Henry, Claire V, Virginie, Stéphanie, Damien** et **Abdul**.

Je remercie tout les service administratif et bibliothèque, **Nadine, Sylvie, Annie, Francine.**

Je suis également très reconnaissant envers **Marianne, Marion, Loïc, Coralie** et **Ivan** pour leur aide et participation à cette étude.

Pour finir je voudrais vraiment adresser une pensée amical en dehors du cadre du travail aux personnes pour qui j'ai beaucoup d'estime, **Roms, Gustavo, Consuelo, Fredo, Victor, Lety, Nicola Bernet, Diana, Jean-Phi, Guillermina, Laurent, Arodi, Arnaud et Nadine D.**

TABLE DES MATIERES

Avant propos	18
Introduction	21
Etude bibliographique :	24
CHAPITRE 1. Généralités sur les systèmes intensifs d'élevage de porcs	25
1.1. De l'élevage de porcs à la production porcine	25
1.2. Les différents systèmes d'élevage de porcs en France	27
1.2.1. Le système d'élevage intensif sur caillebotis	28
1.2.2. Les rejets des systèmes d'élevage sur caillebotis	28
1.2.3. Le système d'élevage sur litières	30
1.2.4. Les rejets des systèmes d'élevage sur litières	31
1.2.5. Le système d'élevage en plein champ	31
1.3. La réglementation pour la gestion des déchets porcins	32
1.3.1. La réglementation du stockage et de l'épandage	32
1.3.2. La réglementation des composés polluants	32
1.4. La problématique environnementale des déchets porcins	33
1.4.1. La pollution des eaux	34
1.4.2. La pollution de l'air	35
1.4.3. La pollution du sol	37
1.4.4. Le risque sanitaire lié à l'épandage	38
1.5. Les traitements des lisiers et des fumiers	40
CHAPITRE 2. Généralités sur la caractérisation des écosystèmes microbiens	42
2.1. L'écologie microbienne	42
2.2. L'étude de la diversité microbienne	43
2.2.1. L'identification microbienne en microbiologie classique	43
2.2.2. La phylogénie moléculaire	45
2.2.2.1. L'ARNr comme marqueur pour identifier les micro-organismes	46
2.2.3. Construction d'arbres phylogénétiques	47
2.2.3.1. Construction d'arbres phylogénétiques par les méthodes fondées sur les distances	48
2.2.3.2. Construction d'arbres phylogénétiques par les méthodes fondées sur les caractères	49
2.3. L'analyse de la diversité microbienne	50
2.3.1. L'analyse des trois domaines du monde vivant	50
2.3.2. Biais et limitations méthodologiques des études d'écologie microbienne moléculaire	52
CHAPITRE 3. Les déjections animales : une communauté microbienne en transit	54
3.1. L'écosystème du tube digestif porcin	54

3.1.1. La flore du tube digestif porcin	55
3.1.2. La flore des fèces porcins	57
3.2. Le fonctionnement du tube digestif porcin	59
3.2.1. Etapes de la digestion anaérobie	61
3.2.2. Les relations syntrophiques et les compétitions dans la digestion anaérobie	67
3.2.2.1. L'effet de l'hydrogène	67
3.2.2.2. L'effet de l'acétate	68
3.2.3. Compétition avec les bactéries sulfato-réductrices	69
3.3. Changements du tube digestif au lisier	71
3.3.1. Le changement des conditions physiques et chimiques	71
3.3.2. La flore microbienne	73
3.4. Changements du tube digestif au fumier	76
3.4.1. Le changement des conditions physiques et chimiques	76
3.4.2. La flore microbienne	77
Un dernier commentaire	79
CHAPITRE 4. Matériels et méthodes	81
4.1. Description des porcheries	82
4.1.1. Description de la porcherie utilisée pour l'inventaire moléculaire de la communauté microbienne du lisier de porcs.	82
4.1.2. Description des porcheries utilisées pour l'inventaire moléculaire de la communauté microbienne du fumier de porcs.	83
4.1.3. Description de la porcherie utilisée pour le suivi des indicateurs de contamination fécale du porc par PCR en temps réel.	84
4.2. Description des techniques de biologie moléculaire	86
4.2.1. Le prélèvement et la conservation des échantillons	87
4.2.2. Extraction de l'ADN total	90
4.2.3. Construction des banques ADNr 16S/18S	90
4.2.4. Séquençage et analyse phylogénétique	94
4.2.5. L'analyse SSCP	96
4.2.5.1. Amplification de la région V3 de l'ADNr 16S	97
4.2.5.2. Préparation des amplicons pour l'analyse SSCP	98
4.2.6. La PCR en temps réel ou quantitative (PCRq)	98
4.2.6.1. Les méthodes de détection des produits amplifiés	99
4.2.6.2. La réaction et ses paramètres	103
4.2.7. Les systèmes de détection testés en PCR en temps réel	106
4.3. Description des techniques d'analyse physico-chimiques	111
4.3.1. Les mesures <i>in situ</i>	111
4.3.2. Le prélèvement et la conservation des échantillons	111
4.3.3. Méthodes analytiques	113

CHAPITRE 5. Caractérisation microbiologique et physico-chimique du lisier de porcs	116
5.1. Les objectifs et la stratégie.	117
5.2. Résultats et discussion	117
5.2.1. Les conditions physico-chimiques	117
5.2.2. Inventaire moléculaire de la communauté microbienne du lisier	120
5.2.2.1. Courbes de raréfaction	122
5.2.2.2. Diversité et abondance bactérienne	123
5.2.2.2.1. <i>Eubacterium</i> et apparentés (RDP registration [reg.] no. 2.30.4)	124
5.2.2.2.2. <i>Clostridium</i> et apparentés (RDP reg. no. 2.30.9)	127
5.2.2.2.3. Groupe <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> (RDP reg. no. 2.30.7)	129
5.2.2.2.4. <i>Mycoplasma</i> et apparentés (RDP reg. no. 2.30.8)	131
5.2.2.2.5. <i>Sporomusa</i> et apparentés (RDP reg. no. 2.30.3)	133
5.2.2.2.6. Groupe <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i> (RDP reg. no. 2.15)	133
5.2.2.2.7. Spirochètes et apparentés (RDP Reg. No 2.27)	135
5.2.2.2.8. <i>Proteobacteria</i> (RDP reg. no. 2.28)	136
5.2.2.2.9. Groupes phylogénétiques minoritaires	136
5.2.2.3. Diversité et abondance des <i>Archaea</i>	137
5.2.2.3.1. Groupe d' <i>Archaea</i> non cultivées	137
5.2.2.3.2. <i>Methanobacteriales</i> et <i>Methanomicrobiales</i> (RDP reg. no. 1.1.2 et 1.1.3.1, respectivement)	139
5.2.2.4. Diversité et abondance des eucaryotes	140
5.2.2.4.1. <i>Nématoda</i> (RDP reg. no. 3.10.10.4.)	140
5.2.2.4.2. <i>Stramenopiles</i> (RDP reg. no. 3.14)	140
5.2.2.4.3. <i>Alveolata</i> (RDP reg. no. 3.13)	141
5.2.2.4.4. <i>Entamoebidae</i> (RDP reg. no. 3.4.1)	142
5.2.2.5. Origine des séquences apparentées aux phylotypes du lisier	142
5.2.3. Construction de la chaîne trophique	143
5.2.4. A la recherche de l'effet du sulfure d'hydrogène	148
5.2.5. A la recherche de l'effet de l'ammoniac	149
5.3. Conclusion	151
CHAPITRE 6. Caractérisation physico-chimique et microbiologique du fumier de porcs	154
6.1. Les objectifs et la stratégie	155
6.2. Résultats et discussion	156
6.2.1. Les conditions physico-chimiques	156
6.2.2. Inventaire moléculaire de la communauté microbienne des fumiers de porcs et placement phylogénétique des espèces	158
6.2.3. Diversité et abondance bactérienne	160
6.2.3.1. <i>Eubacterium</i> et apparentés	161
6.2.3.2. <i>Clostridium</i> et apparentés	163

6.2.3.3. Groupe <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>	164
6.2.3.4. <i>Mycoplasma</i> et apparentés	166
6.2.3.5. Groupe <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i>	168
6.2.3.6. <i>Proteobacteria</i>	171
6.2.3.7. Groupes phylogénétiques minoritaires	173
6.2.3.8. Groupes non affiliés	173
6.2.4. Diversité et abondance des Archaea	174
6.2.4.1. Groupe <i>Archaea</i> non cultivées	175
6.2.4.2. Groupes <i>Archaea</i> méthanogènes	176
6.3. Conclusion	178
CHAPITRE 7. Mise au point d'un système de détection d'un indicateur de contamination fécale porcine par PCR quantitative	180
7.1. Les objectifs et la stratégie	181
7.1.1. Les objectifs	181
7.2. Résultats et discussion	183
7.2.1. Le dessin du système PIMA1	183
7.2.2. Vérification <i>in silico</i> des amorces et de la sonde du système PIMA1	186
7.2.3. Vérification des amorces par PCR non quantitative	190
7.2.4. Préparation des standards pour la droite étalon	191
7.2.5. Optimisation des amorces	191
7.2.6. Réalisation de la droite étalon	194
7.2.7. Essais de quantification absolue sur les échantillons de la filière	197
7.2.8. Vérification de l'absence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons d'origine solide	201
7.2.9. Système de détection <i>Enterococcus</i>	202
7.2.9.1. Les essais de quantification absolue des <i>Enterococcus</i>	202
7.3. Conclusion	205
Conclusions générales et perspectives	207
References	217
Annexes	233

Liste des abréviations et de la nomenclature

ADNr	Acide Désoxyribonucléique ribosomal
ADNr 16S	Acide Désoxyribonucléique ribosomal 16S
AGV	Acides Gras Volatiles (acides gras à chaînes courtes)
ARN	Acide Ribonucléique
CH₄	Méthane
CI	Carbone Inorganique
COT	Carbone Organique Total
CT	Carbone Total
Ct	Threshold cycle en anglais
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DBO₅	Demande Biochimique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
F	Forward
FAM	6-Carboxifluorescéine
FPP	Fumier de porcs sur paille
FPS	Fumier de porcs sur sciure
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert en anglais
H₂S	Sulfure d'hydrogène
mer	Unité du nombre de bases d'une séquence nucléotidique
MES	Matières en Suspension
MGB	Minor Groove Binder
MS	Matière Sèche
MVS	Matières Volatiles en Suspension
N	Azote
N-ammoniacal	Azote ammoniacal
NH₂OH	Hydroxylamine
NH₃	Ammoniac
NH₄⁺	Ammonium
N₂O	Protoxyde d'azote ou oxyde nitreux
NO₂⁻	Nitrite
NO₃⁻	Nitrate
NTK	Azote Total Kjeldahl
OTU	Operational Taxonomique Unit (synonyme de phylotype)

pb	Pair de bases nucléotidiques
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCRq	Polymerase Chain Reaction quantitative
QNF	Quencher non fluorescent
R	Reverse
RDP	Ribosomal Database Project
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revolutions par minute
Rn	Unité de la fluorescence pendant la réaction de PCRq
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TAMRA	Tetramethylrhodamine
V3	Variable 3

Caractères spéciaux

Δ	Augmentation
ΔRn	Augmentation de la fluorescence

Liste de cartes, figures, graphiques, images et tableaux

Cartes :

- Carte a1.** Evolution de la teneur en nitrates entre 1992 et 2003 dans les eaux superficielles. **253**
- Carte a2.** Evolution de la teneur en nitrates entre 1992 et 2003 dans les nappes d'eau. **254**

Figures :

- Figure 1.1.** Les modes ou systèmes de conduite d'élevage et leur type de déjection produit dans le cas des exploitations intensives (A et B). **27**
- Figure 1.2.** Différents types de pollutions (eau, air, sol) liés aux activités d'élevage **34**
- Figure 1.3.** Image de l'épandage de lisier dans le sol. **37**
- Figure 2.1.** Principaux aspects à étudier pour comprendre le fonctionnement d'une communauté microbienne. **43**
- Figure 2.2.** Carte schématique de l'organisation du gène *rrn* de la région B d'*E. coli*. **47**
- Figure 2.3.** Arbre phylogénétique des trois domaines du monde vivant formé à partir des séquences d'ADNr 16-18S. **50**
- Figure 3.1.** Schéma du tractus gastro-intestinal du porc, de l'estomac au rectum, et distribution de la flore microbienne détectée par des méthodes de microbiologie classique ou moléculaire (caractères gras) nommés selon le Ribosome Database Project II. **55**
- Figure 3.2.** Schéma de la chaîne trophique de la digestion anaérobie et ses différentes étapes. **60**
- Figure 3.3.** Voie du catabolisme de la cystéine conduisant à la production de pyruvate, d'ammoniac et de sulfure d'hydrogène. **62**
- Figure 3.4.** Schémas des systèmes anaérobies méthanogènes typiques des sédiments et digesteurs anaérobies (A), et typiques des environnements intestinaux et du rumen. **65**
- Figure 3.5.** Fermentation du glucose par *Ruminococcus albus*. **68**
- Figure 3.6.** Aspects thermodynamiques des réactions d'acétogénèse dans un écosystème comme les sédiments ou les digesteurs anaérobies. **69**
- Figure 3.7.** Compétition pour l'acétate entre les bactéries sulfato-réductrices et les *Archaea* méthanogènes acétotrophes. **70**

Figure 3.8. Voies d'obtention d'azote ammoniacal (a) à partir de l'hydrolyse de l'urée et (b) du catabolisme des acides aminés.	72
Figure 4.1. Schéma de la filière choisie pour le suivi des indicateurs de contamination fécale dans un système d'élevage sur caillebotis.	85
Figure 4.2. Schéma de la méthodologie utilisée pour l'étude de la diversité microbienne des lisiers de porcs à partir d'un inventaire moléculaire (A) et de la structure globale de la communauté microbienne (B).	86
Figure 4.3. Prélèvement dans la préfosse du bâtiment des porcs à l'engraissement de type caillebotis.	88
Figure 4.4. Les différentes étapes de l'identification des espèces microbiennes par SSCP.	97
Figure 4.5. Principe de la PCR en temps réel avec le Sybr Green.	100
Figure 4.6. Etapes de la PCRq (A) et dégradation d'une sonde de type TaqMan (B).	101
Figure 4.7. Structures des sondes TaqMan (A), TaqMan-MGB (B) et du tripeptide dihydrocyclopyrroloindole (C).	102
Figure 4.8. Représentations d'une amplification par PCR d'un fragment d'ADN.	104
Figure 4.9. Représentation en échelle logarithmique d'amplifications par PCR de 4 dilutions d'un ADN de référence ou standard.	105
Figure 4.10. Schéma d'une plaque pour l'essai de quantification absolue et répartition des différents.	106
Figure 4.11. Courbe étalon d'un essai de PCRq.	107
Figure 4.12. Schéma de l'élaboration des standards de la droite étalon du système <i>Enterococcus</i> .	109
Figure 4.13. Sédimentation normale du lisier en fosse de stockage.	111
Figure 4.14. Schéma de la méthodologie utilisée pour l'analyse physico-chimique des échantillons de lisier de porcs, porcherie La Pomarède.	112
Figure 5.1. Courbes de raréfaction des inventaires <i>Bacteria</i> (bleue), <i>Archaea</i> (orange) et <i>Eucarya</i> (verte).	123
Figure 5.2 (a). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Eubacterium</i> et apparentées (RDP Reg. No 2.30.4).	125
Figure 5.2 (b). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Clostridium coccoides</i> (RDP Reg. No 2.30.4).	126
Figure 5.3 (a). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Clostridium</i> et apparentées (RDP Reg. No 2.30.9).	128
Figure 5.3 (b). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au sous-groupe <i>Clostridium leptum</i> (RDP Reg. No 2.30.9).	129

Figure 5.4. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées à la subdivision <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> (RDP Reg. No 2.30.7).	130
Figure 5.5. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Mycoplasmas</i> et apparentées (RDP Reg. No 2.30.8).	132
Figure 5.6. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliés au <i>Sporomusa</i> et apparentées (RDP reg. no. 2.30.3).	133
Figure 5.7. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i> et apparentées (RDP reg. no. 2.15).	134
Figure 5.8. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au Spirochetes et apparentées (RDP Reg. No 2.27) et à l'assemblage <i>Flexistipes sinusarabici</i> (RDP reg. no. 2.14).	135
Figure 5.9. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au Proteobacteria (RDP reg. no. 2.28) et au groupe <i>Fibroacter</i> (RDP reg. no. 2.25).	136
Figure 5.10. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S non cultivées.	138
Figure 5.11. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées aux groupes <i>Archaea</i> méthanogènes.	139
Figure 5.12. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 18S partielles affiliées au domaine <i>Eucarya</i> .	141
Figure 5.13. Ecosystème anaérobie hypothétique du lisier de porc.	144
Figure 5.14. Effet de l'acétate dans l'écosystème.	146
Figure 5.15. Effet du sulfure d'hydrogène dans l'écosystème.	149
Figure 5.16. Effet de l'ammoniac dans l'écosystème.	151
Figure 6.1. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Eubacterium</i> et apparentées.	162
Figure 6.2. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Clostridium</i> et apparentées.	164
Figure 6.3. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées à la subdivision <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> .	165
Figure 6.4. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe <i>Mycoplasma</i> et apparentés.	167
Figure 6.5 (a). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S du sous-groupe <i>Cytophaga</i> I et du groupe <i>Cytophaga aurantiaca</i> affiliées au groupe <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i> .	169
Figure 6.5 (b). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S du sous-groupe <i>Bacteroides</i> affiliées au groupe <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i> .	170

Figure 6.6. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées aux Proteobacteria.	172
Figure 6.7. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S non affiliées qui ont formé les clusters A, B, et C.	174
Figure 6.8. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe CA11 et apparentées.	176
Figure 6.9. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées aux groupes <i>Archaea</i> méthanogènes. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1.	177
Figure 7.1. Méthodologie utilisée pour la détection et la quantification des indicateurs de contamination fécale dans la filière d'Albi. La stratégie suivie pour le système développé à partir d'un clone de l'environnement est indiquée en A, celle pour le système déjà publié est en B.	182
Figure 7.2. Groupe affilié à la subdivision <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> utilisé pour le développement de l'indicateur de contamination fécale de porcs.	183
Figure 7.3. Séquence du clone PIMALC07 utilisée pour le dessin du système PIMA1.	184
Figure 7.4. Cinétiques d'amplification des essais effectués pour l'optimisation des concentrations d'amorces.	193
Figure 7.5. Droites étalons obtenues à partir des conditions de réaction optimisées pour le système PIMA1. (A) et (B) représentent la droite étalon des échantillons les moins et les plus dilués respectivement.	196
Figure 7.6. Résultats de quantification par PCRq des échantillons de la filière d'élevage.	199
Figure 7.7. Résultats des rapports PIMA/ADNr 16S totaux (en pourcentage) pour les échantillons de la filière d'élevage.	200
Figure 7.8. Contrôle des inhibiteurs sur la réaction PCRq des échantillons d'origine solide et les sols.	202
Figure A. Comparaison entre les groupes bactériens trouvés dans le LPE (a) et ceux trouvés par Leser <i>et al.</i> , (2002) dans le TGP (b).	209
Figure B. Comparaison entre les groupes bactériens trouvés dans le LPE (a) et ceux trouvés dans le fumier de porcs (b).	212
Figure a5.1. Nombre de pics du profil SSCP obtenus sur lisier de porcs d'engraissement avec les amorces <i>Bacteria</i> .	235
Figure a5.2. Comparaison des profils SSCP obtenus sur fèces et sur lisier de porcs d'engraissement avec les amorces <i>Bacteria</i> . Les flèches noires et vertes correspondent aux pics en commun et différents entre les deux échantillons respectivement.	236
Figure a5.3. Comparaison du nombre de phylotypes (a) et de nombre de clones (b) entre les trois banques génomiques bactériennes obtenues à partir de l'ADN extrait du LPE.	238

Graphiques :

Graphique 1. Production des déjections animales brutes par type de bétail (d'après AGRESTE Statistique agricole annuelle 1995, données sur le cheptel français). 20

Images :

Image 4.1. Photos des différents échantillons solides. 89

Tableaux :

Tableau 1.1. Production porcine en Europe. 26

Tableau 1.2. Les caractéristiques chimiques moyennes d'un lisier porcin. 29

Tableau 1.3. Les caractéristiques chimiques moyennes d'un fumier porcin selon le type de litière. 31

Tableau 1.4. Principales voies d'exposition aux déjections animales destinées à l'épandage. 38

Tableau 1.5. Prévalence de certains pathogènes dans le lisier de porcs frais. 39

Tableau 2.1. Cultivabilité des bactéries de divers habitats. 44

Tableau 3.1. Affiliation phylogénétique des séquences *Bacteria* trouvées dans l'inventaire moléculaire du tractus digestif de porcs. 57

Tableau 3.2. Diversité microbienne dans les fèces de porcs. 59

Tableau 3.3. Bioconversion anaérobie incomplète et complète d'un hexose (glucose) en méthane. 66

Tableau 3.4. Dénombrement de la flore bactérienne du lisier de porcs. 73

Tableau 3.5. Diversité microbienne dans le lisier de porcs. 74

Tableau 3.6. Diversité microbienne dans le fumier de porcs. 78

Tableau 4.1. Composition de la nourriture des porcs. 83

Tableau 4.2. Caractéristiques des élevages producteurs de fumiers prélevés pour cette étude. 84

Tableau 4.3. Séquences et cibles des différentes amorces utilisées dans cette étude. 91

Tableau 4.4. Réactifs pour les différentes réactions de PCR. 92

Tableau 4.5. Paramètres de l'amplification par PCR sur colonie, pour la SSCP et pour le séquençage. 95

Tableau 4.6. Séquences et positions des amorces et de la <u>sonde</u> du système <i>Enterococcus</i> .	108
Tableau 4.7. Réactifs pour la réaction PCRq du système <i>Enterococcus</i> (essai de quantification absolue).	109
Tableau 4.8. Séquences et position des amorces et de la <u>sonde</u> du système de détection des ADNr 16S totaux.	110
Tableau 4.9. Réactifs pour la réaction PCR en temps réel du système de détection des ADNr 16S totaux.	110
Tableau 5.1. Mesures <i>in situ</i> dans la préfosse d'engraissement.	118
Tableau 5.2. Analyses physico-chimiques des fractions totale et soluble du lisier.	119
Tableau 5.3. Affiliation phylogénétique des séquences <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> et <i>Eucarya</i> trouvées dans l'inventaire moléculaire du lisier.	121
Tableau 5.4. Origine et similarité des séquences apparentées aux phylotypes <i>Bacteria</i> du lisier.	142
Tableau 6.1. Analyses physico-chimiques des fumiers sur paille et sur sciure.	157
Tableau 6.2. Affiliation phylogénétique des séquences <i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i> trouvées dans l'inventaire moléculaire des fumiers porcins.	159
Tableau 6.3. Origine et similarité des séquences apparentées aux phylotypes <i>Bacteria</i> des fumiers.	160
Tableau 7.1. Séquences des amorces et de la sonde du système PIMA1.	185
Tableau 7.2. Caractéristiques des amorces et de la sonde du système PIMA1.	185
Tableau 7.3. Vérification <i>in silico</i> de la spécificité des amorces et de la sonde du système PIMA1.	187
Tableau 7.4. Réactifs pour la réaction PCRq du système PIMA1 (essai d'optimisation des amorces).	192
Tableau 7.5. Efficacités d'amplification et coefficients de corrélation obtenus pour les cinétiques des trois couples d'amorces testés en PCRq (Premier essai).	192
Tableau 7.6. Efficacités et coefficients de corrélation obtenus pour les cinétiques des trois couples d'amorces testées en PCRq (deuxième essai).	194
Tableau 7.7. Quantité d'ADN et nombre de copies de la séquence cible dans les standards testés.	195
Tableau 7.8. Quantification par PCRq des <i>Enterococcus</i> (essai de quantification absolue). Le pourcentage correspond aux écarts type de l'ADN quantifié.	203
Tableau 7.9. Effet du pipetage sur la réaction de PCRq du système <i>Enterococcus</i> (essai de quantification absolue).	204

Tableau 7.10. Evaluation des systèmes testés par PCR quantitative.	206
Tableau a4.1. Tableau des dilutions des standards.	234
Tableau a5.1. Affiliations des phylotypes de l'inventaire du lisier de porcs.	239
Tableau a6.1. Affiliations des phylotypes de l'inventaire du fumier de porcs.	243
Tableau a7.1. Dates et nomenclatures des échantillons utilisés pour le suivi des indicateurs de contamination fécal de porcs d'une filière par PCRq.	248
Tableau a7.2. Résultats des matières sèches des échantillons de la filière porcine.	250
Tableau a7.3. Calculs des nombre total de copies/ μ L pour les standards (A) et de nombre total de copies/g MS pour les échantillons (B).	252

AVANT PROPOS

Avant-propos

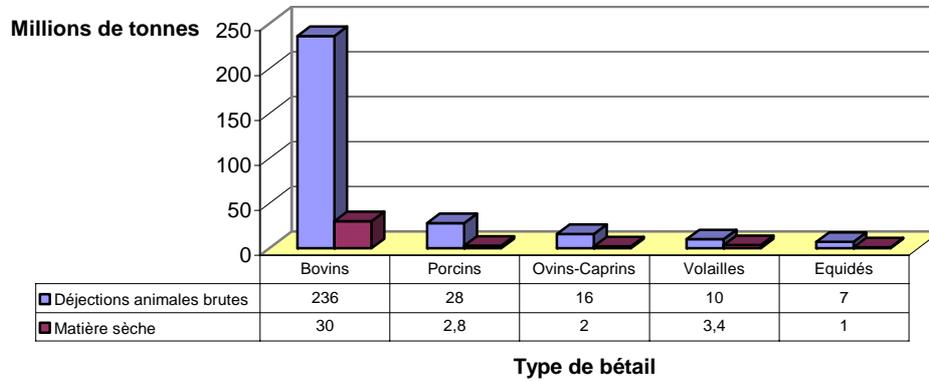
La majorité des problèmes de pollution agricole ou agro-alimentaire rencontrés à l'heure actuelle résultent d'un déséquilibre des cycles de la matière. Les flux de production de matière (organique, azotée, etc.) excédant leur flux de décomposition par les micro-organismes, c'est-à-dire que la capacité d'épuration naturelle des sols a été dépassée. D'autre part, l'introduction massive de produits xénobiotiques (phytosanitaires, métaux lourds, hydrocarbures, etc...) dans l'environnement suscite des inquiétudes à deux niveaux, soit parce qu'ils sont peu ou mal transformés par les micro-organismes du milieu récepteur, soit parce qu'ils pourraient avoir un impact sur les communautés microbiennes épuratrices du sol ou de la rhizosphère. Enfin, la présence éventuelle de micro-organismes pathogènes dans les rejets demeure un problème préoccupant dans la mesure où il est souhaitable de garantir aux agriculteurs, mais aussi aux consommateurs, l'innocuité de l'épandage.

L'intensification des exploitations modernes d'élevage a eu comme conséquence la concentration d'un plus grand nombre d'animaux sur des surfaces de plus en plus réduites, conduisant à l'accumulation de grandes quantités de déjections animales. Ces déjections se répartissent en trois grands types : les fumiers, les purins et les lisiers.

- Les **fumiers** sont les rejets obtenus à partir des déjections d'animaux élevés sur litière à base de paille, de sciure ou de copeaux de bois ; des produits qui peuvent absorber trois fois leur poids en eau. Parmi les animaux élevés sur litières on trouve les bovins, les volailles et **les porcs** (Texier, 1999 ; Eden, 2000).
- Les **purins** sont les eaux d'écoulement des fumiers (Eden, 2000).
- Les **lisiers** sont les rejets obtenus à partir des déjections des animaux élevés sans litière, dans des systèmes hors sol, sur des caillebotis¹ ou sur un sol en béton raclé. Les groupes d'animaux susceptibles de produire du lisier sont les espèces avicoles comprenant les volailles, les cunicoles (les lapins), les bovins et **les porcins** (Eden, 2000).

¹ Plancher à lattes non jointives en métal ou en béton.

Les exploitations modernes françaises produisent environ 300 millions de tonnes de déjections animales brutes par an, soit 40 millions de tonnes de matière sèche (Graphique 1.1).



Graphique 1.1. Production des déjections animales brutes par type de bétail (d'après AGRESTE Statistique agricole annuelle 1995, données sur le cheptel français).

Dans les déjections animales, les effluents bovins sont largement dominants et se présentent surtout sous la forme de fumiers. Cependant, c'est le problème de gestion du lisier qui est le plus apparent pour le public à cause des nuisances et des problèmes environnementaux qu'il a engendré. **Le lisier concerne la quasi-totalité de la production porcine.**

INTRODUCTION

Introduction

L'augmentation du nombre de porcheries et de leur capacité est à l'origine de résultats néfastes pour l'homme et son environnement. Cet élevage massif demande des mises en place très particulières telles que les caillebotis et les préfosse de récupération des effluents, pour pouvoir travailler le plus simplement possible avec un nombre d'animaux aussi considérable. Les déchets ne sont plus séparés, formant un mélange de déjections animales, d'eau de lavage et d'un apport variable d'aliment perdu par l'animal appelé **lisier**. Pour la majorité de ces effluents, l'épandage sur le sol se fait sans traitement préalable. Cette quantité trop importante de lisier est à l'origine de problèmes d'odeurs, de pollution des nappes phréatiques, de production d'ammoniac et de la dissémination de germes indésirables. Les élevages producteurs de **fumiers**, le second type de déchet produit par les exploitations porcines, sont d'aspect plus traditionnel et bénéficient d'une bonne image vis à vis du public. Ils présentent l'avantage de ne pas produire de lisier malodorant, ils sont donc moins polluants que les élevages sur caillebotis.

Un Groupement d'Intérêt Scientifique français nommé "Porcherie Verte" a été mis en place afin de « développer les systèmes de production porcine compétitifs satisfaisant un haut niveau d'exigences quant au respect de l'environnement ». Il finance plusieurs actions de recherche dont plusieurs ont pour objectifs : **1)** de mieux comprendre les modifications des déchets stockés au cours du temps et d'en tirer des solutions adéquates afin de remédier aux problèmes d'odeur, de pollution et de dissémination de germes pathogènes ; et **2)** d'étudier les possibilités de développement d'autres modes de conduite d'élevage, comme les élevages sur litière par exemple. Les solutions proposées seront mises en relation avec une étude portant sur l'économie et sur les moyens de traitement des animaux qu'elles nécessiteront. Ces actions sont menées par un ensemble d'entreprises publiques ou privées travaillant dans des domaines variés mais qui ont toutes le même but, celui d'améliorer la qualité des élevages porcins. **La caractérisation de la flore microbienne des déchets d'élevage de porcs** entre dans le programme "Porcherie Verte" et plus particulièrement dans le groupe « gestion des effluents ».

Longtemps considéré comme un amendement bon marché pour l'agriculture, le lisier a été étudié essentiellement pour ses propriétés physico-chimiques et agronomiques. Seules quelques études microbiologiques classiques de culture et d'isolement en laboratoire ont été réalisées. La plupart s'est concentrée sur la survie des micro-

organismes pathogènes et des indicateurs de contamination fécale. L'évolution des moyens techniques, tels que la biologie moléculaire, a permis de constater que les méthodes classiques d'étude des micro-organismes ne sont pas adaptées pour des environnements complexes telle que les lisiers et les fumiers où l'isolement et l'identification de tous les micro-organismes en présence est irréalisable. Afin de suivre des micro-organismes encore non cultivés, les techniques de biologie moléculaire peuvent être utilisées. Avec ces techniques, les micro-organismes ne sont plus classés en fonction de leurs propriétés physiologiques (ou métaboliques) mais en fonction de leur matériel génétique ; on appelle cette classification : la classification phylogénétique. On ne parle plus d'espèce mais d'OTU (Operational Taxonomic Units) ou de phylotypes. Un phylotype contient toutes les séquences descendant d'un même ancêtre et présentant une divergence inférieure à un seuil préalablement défini (<3%). En fonction de la similarité des séquences on peut agréger les phylotypes et définir des familles phylogénétiques. Le lisier est considéré comme un milieu complexe et, lorsque ces travaux ont été initiés, aucune caractérisation phylogénétique de sa microflore n'avait été effectuée. Depuis, seulement deux exemples ont été publiés (Whitehead et Cotta, 1999 ; Whitehead et Cotta, 2001). Aucune étude de ce type ne semble avoir été effectuée sur le fumier de porcs.

Pour arriver au **but** de mieux comprendre les écosystèmes représentés par le lisier ou le fumier de porcs nous avons choisi comme **stratégie** de considérer chaque déchet comme un écosystème spécifique, qui est caractérisé par les composants suivants *i*) une communauté microbienne active et latente qui s'adapte ou meurt devant les changements du milieu, *ii*) un milieu physico-chimique spécifique qui définit l'environnement de la communauté microbienne et *iii*) des interactions entre ces deux composants qui vont transformer l'environnement. Les chapitres 5 et 6 de la partie des résultats traiteront donc des caractérisations physico-chimiques et microbiologiques de lisiers et de fumiers, respectivement. Le chapitre 7 portera sur le développement d'un système de PCR quantitative permettant le suivi moléculaire de gènes microbiens de lisier et sur son application sur une filière porcine. Ces chapitres seront précédés d'une étude bibliographique présentant :

- **Chapitre 1** : Généralités sur les systèmes intensifs d'élevage de porcs.
- **Chapitre 2** : Généralités sur la caractérisation des écosystèmes microbiens.
- **Chapitre 3** : Les changements d'écosystème, du tube digestif au lisier ou fumier de porc.

Les matériels et méthodes utilisés pour réaliser cette étude seront présentés dans le chapitre 4.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

Généralités sur les systèmes intensifs d'élevage de porcs

1.1. De l'élevage de porcs à la production porcine.

A la fin de la Seconde Guerre mondiale, la production porcine française est essentiellement traditionnelle avec des élevages de petite taille très dépendants du reste de l'exploitation pour l'alimentation des animaux (**Fig. 1.1C**). Dix ans plus tard, la situation reste inchangée. Un recensement général de l'agriculture de 1955 donne l'image d'une France où l'élevage de porcs est réparti sur presque tout le territoire (Rainelli, 2001).

L'essor industriel de la France de la décennie 1960 s'accompagne d'un important exode agricole qui a deux conséquences : d'une part, on assiste à une hausse du niveau de vie et à de profondes modifications des habitudes alimentaires des Français et, d'autre part, la baisse du nombre d'actifs dans les exploitations agricoles remet en cause les formes d'agriculture de nature traditionnelle. L'élevage intensif est alors encouragé dans les pays occidentaux par les politiques agricoles nationales et communautaires.

Après plusieurs crises du secteur porcin français, un plan de rationalisation de la production est lancé en 1970 afin de moderniser l'appareil de production. Ce plan va accompagner **l'évolution du secteur vers son industrialisation, qui va passer d'un système d'élevage à un système de production**. En Europe, c'est le modèle néerlandais qui va servir de référence. Ce pays s'est spécialisé dans l'élevage hors sol, c'est-à-dire un élevage où les animaux sont élevés dans des bâtiments fermés, sur caillebotis intégral ou partiel. Ce système autorise une gestion plus aisée des effluents puisque ceux-ci s'écoulent directement sans qu'il y ait de manipulations comme c'était le cas dans les systèmes traditionnels (Rainelli, 2001). A partir de 1970, les animaux vont être sélectionnés génétiquement. Le croisement des races Large White et Landrace, puis le recours à des truies hyper prolifiques, vont permettre un accroissement du nombre de porcelets par truie productive. L'alimentation des

animaux va être basée principalement sur des aliments concentrés qui ne sont pas produits par les sols de l'exploitation. Ainsi, l'élevage va se développer sans contrainte de surface. De tous les types d'élevage, c'est celui du porc qui va connaître le développement le plus important.

La recherche d'une toujours plus grande productivité va conduire à élever les trois quarts des truies et 90 % des porcs à l'engraissement dans des bâtiments hors sol. D'autre part, dans un souci de réduire encore les coûts, la production va se concentrer dans des zones très spécialisées, qui regroupent les principaux acteurs de la filière (des usines d'aliments aux industries de transformation) (Martinez et Le Bozec, 2000). La Bretagne, avec ses ports sur l'atlantique permettant de recevoir les bateaux céréaliers et sa proximité relative de la capitale, va monopoliser le développement de l'élevage intensif porcin (Lupton, 1998). Ainsi, avec 444 porcs/km², la Bretagne est la région d'élevage porcin la plus dense et possède la moitié du cheptel national. En Europe, certaines zones peuvent atteindre une densité d'élevage jusqu'à 700 porcs/km² (Pays-Bas).

Aujourd'hui, le nombre de porcs dans l'Union européenne et l'Amérique du Nord est d'environ 126 et 114 millions respectivement (**Tableau 1.1**) (Eurostat, 1998 ; Centre de Référence Statistique, 2001 ; NASS, 2002).

Tableau 1.1. Production porcine en Europe (Eurostat, 1998 ; Burton et Turner, 2003).

Pays	Nombre de porcs (millions de têtes)	Pays	Nombre de porcs (millions de têtes)
Allemagne	23	Irlande	2
Autriche	3	Italie	8
Belgique	7	Luxembourg	< 1
Danemark	13	Pays-Bas	13
Espagne	22	Portugal	2
France	16	Royaume Uni	6
Finlande	1	Suède	2
Grèce	1	Union Européenne (15 pays)	123

Il représente un volume estimé de lisier de 100 millions de tonnes pour l'union européenne et de 91 millions de tonnes pour l'Amérique du Nord (Bernet *et al.*, 2000). La concentration des élevages ainsi que l'augmentation de leur capacité d'accueil ont

amplifié les pollutions générées par le lisier. Ces régions sont aujourd'hui en situation d'excédent structurel en ce qui concerne la gestion de leurs déchets d'élevage.

1.2. Les différents systèmes d'élevage de porcs en France

On peut considérer qu'il existe trois systèmes d'élevage en France, un système non intensif où les porcs sont élevés en plein champs et **deux systèmes intensifs** qui regroupent presque tout le cheptel français : **l'élevage sur caillebotis** et **l'élevage sur litière**. Parmi les 18 000 élevages intensifs recensés en 1999, 85 % sont de type caillebotis, le restant (15 %) de type litière (Texier, 1999). L'élevage en plein champ est anecdotique (**Figure 1.1**).

A



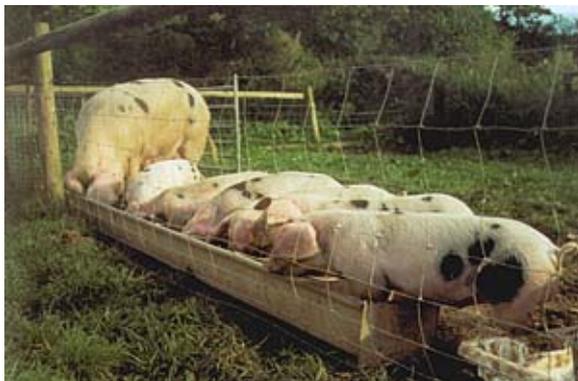
Elevage sur caillebotis
urine + fèces = lisier
~ 85 %

B



Elevage sur litière
urine + fèces + support = fumier
~ 15 %

C



Elevage en plein champ
~ 0,04 %

Figure 1.1. Les modes ou systèmes de conduite d'élevage et leur type de déjection produit dans le cas des exploitations intensives (A et B).

1.2.1. Le système d'élevage intensif sur caillebotis

Dans ce type d'exploitation, le bâtiment d'élevage est entièrement couvert et isolé du sol. Le sol occupé par les animaux est composé d'**un plancher à lattes non jointives en métal ou en béton, le caillebotis, qui permet** l'écoulement des matières fécales, des urines et des eaux de lavage dans des pré-fosses situées en-dessous du bâtiment (**Fig. 1A**). C'est là que se forme le lisier qui contient aussi des traces de désinfectants utilisés dans l'exploitation et des débris alimentaires.

Après un temps de stockage variable de quelques jours à quelques semaines, ces pré-fosses sont vidangées vers des fosses de stockage situées en extérieur. Pendant les périodes hivernales et estivales, le lisier s'accumule dans ces fosses de stockage. Au printemps ainsi qu'à l'automne, le lisier stocké est épandu sur les parcelles agricoles pour amender les cultures. Pendant des décennies, le lisier brut a été épandu comme engrais sur les terres avoisinantes des exploitations porcines, directement à partir des fosses de stockage. Actuellement, il est de plus en plus traité, au minimum par un procédé de séparation (centrifugation ou compaction) qui permet de disposer la phase solide en compostage et la phase liquide en lagunage avant l'épandage.

1.2.2. Les rejets des systèmes d'élevage sur caillebotis

Environ une tonne de lisier est générée pour la production d'un porc charcutier. Un élevage de 500 truies produit donc environ 10 000 m³ de lisier par an, c'est à dire, **20 m³ de lisier par truie** (Clicquot, 2000). L'élevage porcin français produit environ **21 millions de m³ de lisier par an** (Germon *et al.*, 1999).

Les caractéristiques moyennes d'un lisier porcin sont résumées dans le **Tableau 1.2**. On constate les fortes concentrations en matières sèche et en suspension dues probablement aux matières fibreuses contenues dans le lisier. Les fortes concentrations en DCO et DBO₅ révèlent une grande disponibilité des substrats carbonés pour la communauté microbienne présente. Ces deux paramètres indiquent un très fort potentiel de pollution du lisier si on le considère comme un rejet. Les acides gras volatiles (acétate, propionate, butyrate, isovalerate) produits par la communauté microbienne pendant le stockage anaérobie du lisier sont des composés associés aux problèmes d'odeur du lisier. Ils se trouvent à une faible concentration à l'exception de l'acétate.

Tableau 1.2. Les caractéristiques chimiques moyennes d'un lisier porcin (Belli-Filho et Martin, 1996 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Coillard, 1999 ; Wu *et al.*, 1999 ; Lévasseur et Texier, 2001 ; Béline, 2001a).

Paramètre	Concentration
Matière sèche (MS)	65 à 104 g/L
Matière en suspension (MES)	27 à 66 g/L
Demande Biochimique en Oxygène (DBO ₅ ¹)	25 à 40 g/L
Demande Chimique en Oxygène (DCO ²)	50 à 100 g/L
Acide acétique	7,1 g/L
Acide propionique	0,7 g/L
Acide butyrique	0,2 g/L
Acide isovalérique	0,6 g/L
Azote total (NTK)	5 g/L
Azote ammoniacal (N-NH ₄ ⁺)	4 g N-NH ₄ ⁺ /L
Phosphore total	1,3 g/Kg MS
Phosphate dissous	2,15 g/L
Sulfate dissous	4 g/L
Sulfure	0,3 g/L
P ₂ O ₅	3 g/L
K ₂ O	3 g/L
Cuivre pour un lisier d'engraissement	0,837 g/Kg MS
Zinc pour un lisier d'engraissement	1,301 g/Kg MS

Les fortes quantités en azote total (NTK) et ammoniacal observées sont dues à la présence d'une grande quantité d'urée et de protéines qui n'ont pas été digérées dans le système intestinal du porc. La majorité de ce NTK (75 %) sera transformée par les uréases présentes dans les fèces en azote ammoniacal par l'intermédiaire de réactions métaboliques de dégradation de l'urée, des acides uriques, des protéines et des acides aminés (Béline, 2001b). L'azote ammoniacal est une autre source de mauvaise odeur.

¹ La Demande Chimique en Oxygène (DBO₅) mesure la dégradation de la charge carbonée susceptible de être biodégradée.

² La Demande Chimique en Oxygène (DCO) est un paramètre qui mesure la matière oxydable.

Le sulfure est le troisième type de composé malodorant du lisier. Il est produit par le catabolisme des protéines et la réduction dissimilatrice du sulfate réalisé par les micro-organismes. Il peut devenir dangereux pour la santé des animaux car il est très toxique.

Le lisier contient des éléments chimiques qui le valorise comme fertilisant (azote, phosphore, potassium), des amendements organiques ainsi que des micro-éléments (cuivre, zinc). Cependant, d'autres composants peuvent être néfastes pour l'environnement. Le phosphore, sous forme de phosphates, se trouve à une concentration fortement excédentaire dans le lisier (Germon *et al.*, 1999). Il peut occasionner des problèmes environnementaux sérieux tels que l'eutrophisation et les phénomènes de marées vertes. Le potassium, contenu dans les urines sous forme de sels très solubles, peut se retrouver dans les aquifères. Même s'il n'existe pas de risque sanitaire reconnu lié à sa présence dans les eaux souterraines ou de surface, une directive européenne a établi à 10 mg/L sa concentration maximale admissible pour l'eau de consommation humaine (Martinez et Le Bozec, 2000). Les métaux lourds comme le cuivre et le zinc sont aussi présents en très forte concentration due à leur incorporation excessive dans l'alimentation, surtout pendant les premiers jours de vie des porcelets car ils les protègent des maladies digestives.

1.2.3. Le système d'élevage sur litière

Dans le type d'élevage sur litière (*paille ou sciure*) les bâtiments sont aménagés avec 40 à 80 Kg de paille ou 0,1 à 0,2 m³ de sciure par porc (**Fig. 1B**). Les déjections se mélangent à la litière pour former un fumier dont la décomposition commence dans le bâtiment. Parmi les modes d'élevage sur litière, il existe la **litière biomaitrisée et la litière classique raclée ou accumulée**.

Les litières biomaitrisées sont généralement à base de sciure ou de copeaux de bois, des produits qui peuvent absorber trois fois leur poids en eau. La technique consiste à démarrer puis à entretenir une fermentation aérobie de la litière pour fabriquer un compost jeune, en présence même des animaux. Les fumiers récupérés après le passage d'un ou de plusieurs lots de porcs sont stockés en l'état, parfois à l'abri des intempéries pour former très lentement un compost.

Les litières paillées traditionnelles utilisent normalement de la paille comme support et leurs fumiers peuvent être gérés de deux façons différentes : la première (litière

raclée) consiste dans un raclage périodique des aires d'exercice, réalisé au moins deux fois par semaine. La deuxième (litière accumulée) consiste à un enlèvement des litières produites pendant un ou plusieurs mois, en fin de période d'élevage. Dans le cas de ces dernières litières, il est intéressant de procéder à un compostage accéléré pendant au moins trois mois, dès leur évacuation de la porcherie (Texier, 1999).

1.2.4. Les rejets des systèmes d'élevage sur litières

L'élevage sur litière utilise entre 1,5 et 2,0 Kg de paille par jour et par animal, ce qui représente plus de **3 tonnes de fumier par truie, dans l'année**. La production de déjections pour ce type d'élevage est estimée à **2 millions de tonnes de fumier par an**. Les élevages de porcs utilisant des litières de paille ou de sciure diminuent donc le volume des rejets d'environ 4 millions de m³ par an (Texier, 1999). Le **Tableau 1.3** montre quelques indicateurs de la composition chimique de litières biomaîtrisée et classique raclée ou accumulée.

Tableau 1.3. Les caractéristiques chimiques moyennes d'un fumier porcin selon le type de litière (Texier, 1999).

	Matière sèche (MS) (%)	N (Kg/T)	P ₂ O ₅ (Kg/T)	K ₂ O (Kg/T)
Litière biomaîtrisée	32	7	10	9
Litière raclée	28	9	11	11
Litière accumulée	31	8	7,5	13

Ces paramètres sont choisis pour évaluer la qualité des fumiers comme fertilisants, et reflètent donc l'efficacité du mode de gestion des déchets porcins. Même si les valeurs observées sont similaires, la litière biomaîtrisée permet de minimiser la pollution par ruissellement lors de l'épandage car il n'y a plus de fosse à purin, ni de purin liquide ; cette technique a le grand avantage d'éliminer presque complètement les odeurs (Laferrière, 1996).

1.2.5. Le système d'élevage en plein champ

Ce type d'élevage est le plus ancien mais il ne représente aujourd'hui que 0,04 % des élevages en France. C'est un système non intensif car les porcs sont élevés en plein champ et les limitations de surface de sol par porc ne permettent pas d'avoir un grand

nombre d'animaux. Les volumes de déjection ne sont pas importants et ne sont généralement pas traités (**Fig. 1C**).

1.3. La réglementation pour la gestion des déchets porcins

1.3.1. La réglementation du stockage et de l'épandage

La concentration des exploitations dans une même région a créé un déséquilibre entre le nombre d'animaux produits et la surface de sol disponible pour l'épandage des lisiers. **Les apports élevés et répétés de quantités excessives de lisier** par rapport aux besoins réels des cultures, ont entraîné une accumulation des éléments fertilisants dans le sol et un transfert vers les eaux superficielles, souterraines et littorales (Martinez et Le Bozec, 2000). La gestion des lisiers pose donc un problème environnemental du fait notamment de l'importance des excédents à gérer (Lupton, 1998).

En France, la réglementation en matière de stockage et d'épandage des déjections animales indique que **les lisiers** doivent être stockés dans une fosse étanche d'une capacité minimum de stockage de 4 mois et suffisante pour contenir les déjections pendant toute la période où elles ne peuvent pas être épandues dans des conditions environnementalement convenables. Les périodes d'épandage déconseillées sont définies dans le code des bonnes pratiques agricoles. De manière générale, l'épandage est inapproprié au moment où les plantes ne sont pas capables d'absorber l'azote des lisiers (Eden, 2000).

La réglementation concernant le **risque sanitaire** de l'épandage (Décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997) est relative à l'épandage des "boues" issues du traitement des eaux usées. Cette loi a pour objet de définir les conditions dans lesquelles sont épandus sur les sols agricoles, forestiers ou en voie de reconstitution ou de re-végétalisation, les sédiments résiduels des installations de traitement ou de prétraitement biologique, physique ou physico-chimique des eaux usées. A notre connaissance, il n'y a pas de réglementation sanitaire à propos des rejets d'élevage.

1.3.2. La réglementation des composés polluants

A propos de **l'azote**, la directive communautaire sur les nitrates du Conseil du 12 décembre 1991 (décrets françaises du 27 août 1993 et du 4 mars 1996) concernant la

protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles, vise à réduire la pollution des eaux provoquée ou induite par les nitrates et à prévenir toute nouvelle pollution de ce type. En bref, la quantité d'azote contenue dans les effluents d'élevage épandus ne doit pas dépasser 170 Kg par ha et par an (Martinez, 1996).

La gestion du **phosphore** dépend du contexte local. Pour l'agence de l'eau, le taux de phosphore peut dépasser 250 Kg/ha lors de l'épandage (Clicquot, 2000). Toutefois, une réglementation locale du sud-ouest de la France a imposé des rejets inférieurs à 0,267 Kg P₂O₅/m³ d'effluent traité pour l'installation d'un élevage produisant plus de 35 m³/jour (Martinez, 1996).

Les conséquences de l'épandage des effluents d'élevage sur les teneurs en **métaux lourds** du sol et des végétaux cultivés et sur la qualité des eaux souterraines ne font pas l'objet de directives ou de recommandations (Martinez et Le Bozec, 2000). Cependant, une directive de la communauté européenne (86/278/CEE) concernant l'application de boues de station d'épuration qui traite les déjections animales donne une limite de 50-140 et 150-300 mg/Kg de MS pour le cuivre et le zinc, respectivement (Burton et Turner, 2003).

Enfin, l'apport en matière organique dans les cours d'eau, résultat des pratiques d'épandage et de rejet de lisiers, peut augmenter le contenu en carbone organique des lacs et des rivières. L'épuration de cette eau par chloration dans un but domestique sera plus difficile car le processus de chloration d'une eau riche en carbone organique entraîne la formation de composés toxiques appelés trihalométhanes. Actuellement, une norme canadienne fixe la limite de ces composés à 350 g/L d'eau (Laferrière, 1996).

1.4. La problématique environnementale des déchets porcins

Il est maintenant largement reconnu que les modes actuels de gestion des lisiers ont des effets nuisibles sur l'environnement. Les activités d'élevage contribuent à trois types de pollution (**Figure 1.2**). Elles favorisent **(i) la pollution des eaux** de surface et souterraines ; **(ii) la pollution de l'air** par les composés gazeux et malodorants émis dans les bâtiments, lors du stockage ou de l'épandage ; et **(iii) la pollution du sol** qui peut être causée par des apports excessifs de lisiers et conduire à l'accumulation d'éléments chimiques dans les sols. Ces problèmes sont devenus un centre d'intérêt

public et un enjeu pour le développement de la production porcine en France. (Ohta et Ikeda, 1978 ; Bourque *et al.*, 1987 ; Mackie *et al.*, 1998 ; Zhu, 2000 ; McCrory et Hobbs, 2001).

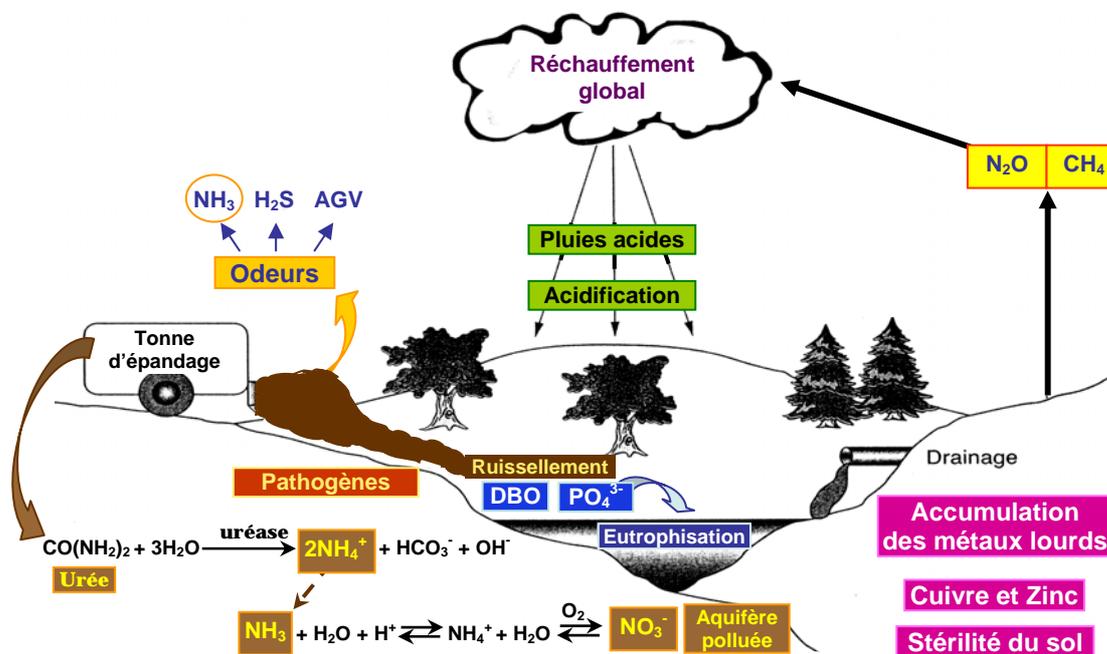


Figure 1.2. Différents types de pollutions (eau, air, sol) liés aux activités d'élevage. (Jongbloed et Lenis, 1998 ; Martinez et Le Bozec, 2000).

1.4.1. La pollution des eaux

Les pollutions d'origine agricole touchent les eaux superficielles, souterraines et littorales. Elles résultent de ruissellements à la suite d'épandages directs ou de lixiviation suite à des apports excessifs de lisiers sur un même sol. Les risques encourus sont sanitaires surtout pour les eaux de surface et liés à la forte teneur en azote et phosphore pour les eaux souterraines et littorales.

Dans le sol, l'azote ammoniacal (forme peu mobile, adsorbée par les colloïdes du sol) va être oxydé en nitrate qui sera **entraîné par lessivage et ruissellement** d'eaux de drainage vers les aquifères lorsque l'épandage se fait en période défavorable (forte pluviosité) (Levasseur, 1998 ; Martinez et Le Bozec, 2000). La formation de nitrates ou nitrification commence avec une étape d'oxydation de l'ammoniac en nitrite lors de la dégradation de la matière organique dans le sol par les bactéries nitrifiantes (*Pseudomonas* spp.). Puis, les nitrites sont rapidement convertis en nitrates dans les

eaux souterraines et les cours d'eau. Cette oxydation est influencée par plusieurs facteurs tels que la température et le type de sol. Les nitrates, très solubles et stables dans l'eau, polluent les nappes souterraines progressivement et leurs effets sont durables (Laferrière, 1996). En Bretagne, certaines zones ont dépassé la limite de 50 mg de nitrate / L d'eau potable suite à la pollution liée au lisier épandu pendant des années. La consommation d'eau fortement contaminée en nitrates présente des risques importants pour la santé humaine comme le développement de la méthémoglobinémie³ et de certaines formes de cancer. En effet, les nitrates et les nitrites peuvent réagir avec des groupements aminés pour former des composés carcinogènes (N-nitroso), ce phénomène a été maintes fois vérifié par des expériences chez les animaux. Les cancers les plus souvent observés dans ces expériences sont ceux de l'œsophage et de l'estomac (Laferrière, 1996). La surveillance de concentrations en nitrates inférieures à 50 mg/L dans les sources d'eau potable est une mesure préventive efficace (**voir Annexes : cartes 1 et 2**) (Laferrière, 1996).

Le phosphore, sous forme de phosphates, favorise le développement d'algues dont la dégradation par les bactéries dans les couches d'eau plus profondes consomme l'oxygène dissous et crée les conditions d'anoxie qui conduisent à l'**eutrophisation** des lacs et des rivières. Ce phénomène est aussi à l'origine des phénomènes de **marées vertes** observés sur le littoral breton (Levasseur, 1998).

1.4.2. La pollution de l'air

Cette pollution est due aux composés produisant des odeurs et aux gaz à effet de serre.

D'une manière générale, **une odeur est définie** comme un mélange d'un grand nombre de molécules organiques ou minérales volatiles ayant des propriétés physico-chimiques très différentes (Le Cloirec *et al.*, 1991 ; Guingand, 1999). Dans les exploitations porcines on peut identifier **deux sources d'odeurs**, les odeurs corporelles liées à l'animal et les déjections. Ces deux sources potentielles d'odeurs sont localisées dans le bâtiment qui abrite à la fois les animaux et leurs déjections quelque soit le type de sol (caillebotis ou litière). Seules les odeurs liées au lisier se retrouvent dans **les unités ou fosses de stockage** à l'extérieur des bâtiments et sur les parcelles d'épandage (Guingand, 1999).

³ Cette maladie est causée par la capacité réduite du sang à transporter l'oxygène vital dans l'ensemble de l'organisme.

L'étape de stockage du lisier est reconnue comme une des sources les plus importantes d'émissions gazeuses malodorantes, y compris l'ammoniac, les acides gras volatiles (AGV) et le sulfure d'hydrogène (Hamano *et al.*, 1972 ; Ohta et Ikeda, 1978 ; Hartung et Phillips, 1994 ; Mackie *et al.*, 1998 ; Zhu, 2000). Ces substances malodorantes très offensives sont la principale cause de nuisances publiques liées aux exploitations porcines avec plus de 50 % de plaintes de voisinage (IEHO, 1988).

La plupart des **composés malodorants** sont les produits finis ou intermédiaires des activités microbiennes fermentaires qui ont eu lieu dans les fèces, l'urine et le lisier. Les AGV, qui sont reconnus comme un indicateur d'odeur, sont les principaux composés malodorants dans les excréments frais de porc (Hamano *et al.*, 1972 ; Ohta et Ikeda, 1978). Ils peuvent être produits, soit par la voie de la déamination des acides aminés pendant la dégradation des protéines, soit par la voie du catabolisme des hydrates de carbone en digestion anaérobie de la matière organique.

L'azote ammoniacal est produit à partir de l'ammonium formé pendant l'hydrolyse microbienne de l'urée et lors de la minéralisation de l'azote organique des composés protéiques contenus dans les déjections animales. Il représente la plus grande source de rejet d'azote ammoniacal atmosphérique en Europe où la France est le premier pays émetteur avec 770 000 tonnes d'ammoniac par an. Environ 80 % de ces émissions ont comme origine les activités agricoles où les contributions relatives des bâtiments+stockage et de l'épandage s'établissent à 35 et 32 %, respectivement (Buijsman *et al.*, 1987 ; Martinez et Le Bozec, 2000).

Un autre composé malodorant et très dangereux, le sulfure d'hydrogène, est produit par la réduction dissimilatrice des sulfates et par la dégradation anaérobie de composés organiques soufrés comme les protéines (Mackie *et al.*, 1998). Son émission dans l'atmosphère dépend du pH et de la température dans les fosses de stockage (Clanton et Schmidt, 2000).

Deux gaz à effet de serre sont produits par les déjections animales : le **protoxyde d'azote (N₂O)** et le **méthane (CH₄)**. Le premier est produit lors de la nitrification de l'ammonium et plus particulièrement lors de la dénitrification incomplète des nitrates. L'émission de N₂O suite à l'épandage de lisier de porcs est estimée à 34,8 g/t. Le méthane est produit par la digestion anaérobie des déjections animales et ses

émissions sont estimées à 28 Mt/an, soit entre 6 et 10 % des émissions totales d'origine anthropique (Martinez, 1999).

1.4.3. La pollution du sol

Le recyclage des déjections animales en agriculture par l'épandage est reconnu comme une pratique qui permet de maintenir et d'améliorer la fertilisation des sols (**Figure 1.3**). Le lisier de porcs est considéré comme un fertilisant de type II avec un rapport C/N inférieur ou égal à 8 (Levasseur, 1998).



Figure 1.3. Image de l'épandage de lisier dans le sol.

Le lisier étant un effluent très riche en matière organique, en azote et en phosphore, il a été longtemps utilisé comme amendement sur les sols agricoles. Cependant, il contient également des métaux lourds (Zn, Cu) en quantités variables qui sont ajoutés, parfois en excès, à l'alimentation des porcs (Levasseur et Texier, 2001). L'épandage répété de lisiers et de fumiers conduit à une saturation et à une accumulation de composés stables tels que le phosphore et les métaux lourds dans le sol et les végétaux cultivés. Cette accumulation entraîne des phénomènes de toxicité irréversibles dans le sol et de contamination des eaux souterraines, lacs et rivières à plus ou moins long terme par lixiviation et ruissellement. Les métaux lourds sont considérés comme potentiellement toxiques pour les organismes aquatiques (Laferrrière, 1996 ; Martinez et Le Bozec, 2000).

1.4.4. Le risque sanitaire lié à l'épandage

Contrairement aux problèmes évidents de pollution liés aux odeurs ou à l'eutrophisation des nappes phréatiques, le problème du devenir des micro-organismes du lisier dans le sol est peu ressenti par le public (Germon *et al.*, 1999). C'est en partie lié au fait que le risque encouru est variable et difficile à évaluer. D'un point de vue théorique, il dépend de la présence d'agents pathogènes dans les rejets d'élevage et de l'éventualité pour le public, ou d'autres animaux, d'entrer en contact avec l'élément souillé. Le risque sanitaire lié à l'épandage des déjections animales exige donc de prendre en compte **les principales voies d'exposition**. Parmi elles, on trouve l'ingestion, le contact et l'inhalation (**Tableau 1.4**).

Tableau 1.4. Principales voies d'exposition aux déjections animales destinées à l'épandage (C.S.H.P.F., 2003).

PRINCIPALES VOIES D'EXPOSITION		
Ingestion	Contact	Inhalation
Bétail au champ	Bétail au champ	Employeurs des exploitations
Consommateurs de végétaux cueillis en plein champ	Agriculteurs et transporteurs	Agriculteurs et transporteurs
Eau potable contaminé	Employeurs des exploitations	Cueilleurs de produits végétaux
	Cueilleurs de produits végétaux	Population près du site d'épandage
	Promeneurs dans les champs	Bétail au champ
	Utilisateurs de produits à base de déjections animales (engrais)	

La voie la plus susceptible d'affecter les populations est l'ingestion due à la contamination microbiologique des cours d'eau et des eaux souterraines suite à des pratiques inadéquates d'entreposage ou d'épandage du **lisier de porc**. Les principaux risques pour la santé humaine liés à ces activités sont **les gastro-entérites** à *Listeria*, *E. coli* O157, *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Campylobacter* et *Gardia*. La prévalence de ces pathogènes dans le lisier de porc est présentée dans le **Tableau 1.5**.

Tableau 1.5. Persistance de certains pathogènes dans le lisier de porcs frais (Burton et Turner, 2003).

Pathogène	Persistance du pathogène (%)
<i>Salmonella</i>	< 0,1
<i>Listeria</i>	< 5
<i>E. coli</i> O157	0,4
<i>Campylobacter</i>	95
<i>Cryptosporidium</i>	< 50

Le type d'élevage et le mode de gestion du lisier ou du fumier vont affecter la persistance des micro-organismes pathogènes. Parmi les stratégies d'élimination des pathogènes on trouve l'augmentation du temps et de la température du stockage, le lagunage, le compostage et l'application du lisier comme aérosol ou l'étalement du fumier lors de l'épandage (Burton et Turner, 2003).

Les voies de l'inhalation et du contact représentent un risque important pour les travailleurs de l'industrie porcine car on estime que l'air des porcheries est 1200 fois plus chargé en micro-organismes que l'air ambiant. Plusieurs auteurs considèrent que l'air des porcheries contient des bactéries Gram positives comme *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. et *Bacillus* sp. à des concentrations proches de 10^5 à 10^7 UFC⁴/m³ d'air (Laferrière, 1996). Parmi les maladies liées aux problèmes respiratoires, on trouve l'asthme professionnel caractérisé par une obstruction bronchique associée au développement d'une hypersensibilité à certaines substances présentes dans les fèces de porcs. Une autre maladie est l'alvéolite allergique, ou maladie du poumon du fermier, qui est attribuée à l'inhalation de *Micropolispora faeni*. La brucellose, maladie contagieuse très rare actuellement, a déjà été transmise des porcs aux travailleurs. La maladie cutanée érysipéloïde, bien que bénigne, est très fréquente chez les travailleurs du porc. Il est à noter que des infections entériques attribuées à la bactérie *Yersinia enterocolitica* ont été observées chez les travailleurs des porcheries (Laferrière, 1996 ; Burton et Turner, 2003).

⁴ Unités Formant de Colonies.

1.5. Les traitements des lisiers et des fumiers

Les systèmes intensifs d'élevage ont prouvé leur efficacité économique et ils restent le modèle de développement actuel pour la profession malgré les problèmes liés à la gestion des déchets produits. Cependant, l'évolution de la réglementation et la prise de conscience des problèmes environnementaux conditionnent aujourd'hui le développement futur de la production porcine en raison de la surface limitée pour l'épandage des déjections (surtout du lisier) (Hartog, 1992). Pour satisfaire à la réglementation et à la pression du public, des méthodes alternatives d'élevage sont envisagées et des procédés de traitement des rejets ont été développés.

Les traitements du lisier utilisent des techniques physico-chimiques et biologiques où la séparation de phase (fraction solide et liquide) est commune à de nombreux procédés. Cette séparation, effectuée par centrifugation, compression ou floculation, constitue souvent la première étape qui permet d'éliminer une grande proportion des pollutions et de réduire les dégagements d'odeurs (Coillard et Texier, 1994 ; Coillard, 1996 ; Clicquot, 2000). C'est une étape importante car elle permet de capter l'azote organique et le phosphore contenus dans la fraction solide. Le produit solide issu de cette séparation, riche en matière organique et fertilisante, se composte très facilement (Burton, 1999 ; Clicquot, 2000). La fraction liquide est généralement traitée par voie biologique (lit bactérien, boue activée ou lagunage anaérobie) pour réduire encore la concentration en matière organique (DCO) et en azote (Martinez et Burton, 1994 ; Clicquot, 2000 ; Béline, 2001b).

Les traitements biologiques les plus utilisés sont (Béline *et al.*, 1998a ; Béline *et al.*, 1999) :

- **Le lagunage anaérobie** qui permet de réduire les odeurs, d'abattre la charge organique de l'effluent (DBO_5) et d'éliminer les germes pathogènes.
- **Le traitement aérobie de type "boues activées"** qui permet en plus, dans certains procédés, d'éliminer l'azote par nitrification-dénitrification.
- **Le traitement par digestion anaérobie dans des méthaniseurs** (Belli-Filho et Martin, 1996). Ce procédé présente l'avantage de produire du biogaz qui peut être valorisé en chaleur ou en électricité. En revanche il ne permet pas de traiter la pollution azotée.
- Une autre technique qui a été validée pour les petites et moyennes installations est **le compostage de lisier**. Il consiste à mélanger lisier et paille, pour épandre un

produit composté sans risque de nuisance. Cette technique est possible car la paille est un excellent support carboné pour dégrader le lisier. On peut ajouter 12 à 15 m³ de lisier par tonne de paille (Texier, 1999 ; Clicquot, 2000).

Quel que soit le procédé utilisé, les concentrations en matières organiques et/ou azotées obtenues dans l'effluent restent élevées et ne permettent pas le rejet en rivière. Les procédés anaérobies génèrent un effluent enrichi en azote ammoniacal plus facilement assimilable par les plantes. Par conséquent, le lisier traité est utilisé pour l'épandage.

Pour le traitement du fumier, les travaux sont axés plutôt sur le mode de conduite de la litière. Ainsi, la litière biomâtrisée apparaît comme une alternative aux litières plus classiques de type raclées ou accumulées. Le compostage de fumier par litière biomâtrisée montre : *i)* une réduction des volumes de déchets de 50 %, *ii)* une augmentation des teneurs en matière sèche, P₂O₅ et K₂O, et *iii)* une amélioration de la teneur azotée de 50 % (Texier, 1999 ; Clicquot, 2000).

CHAPITRE 2

Généralités sur la caractérisation des écosystèmes microbiens

Bien que l'**activité microbienne** soit au cœur des processus de transformation de la matière organique présente dans le lisier et à l'origine de nombreuses nuisances potentielles, comme la production de composés malodorants ou la dispersion de germes indésirables, seulement quelques études ont porté sur la caractérisation microbiologique de cet écosystème (Rivière *et al.*, 1974 ; Bernard et Hédit, 1979 ; Williams et Evans, 1981 ; Bisailon *et al.*, 1984 ; Williams, 1984 ; Zhang et Day, 1996 ; Zhu *et al.*, 1997 ; Sutton *et al.*, 1999 ; Zhu et Jacobson, 1999). La plupart de ces travaux ont été effectués par des approches classiques de microbiologie, isolement et culture. Depuis quelques années, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire a révolutionné la vision que nous avons de nombreux écosystèmes naturels et a conduit au développement d'une discipline particulière : l'Ecologie microbienne moléculaire.

2.1. L'écologie microbienne

L'écologie microbienne se définit comme la science étudiant les relations des micro-organismes entre eux et avec leur environnement (Nalin *et al.*, 1998). Les principaux buts de l'écologie microbienne sont : **i)** la description des communautés microbiennes, **ii)** la caractérisation des conditions physico-chimiques du milieu, et **iii)** la compréhension des activités métaboliques réalisées par les micro-organismes dans leur habitat (Marshall, 1993).

Par définition, une communauté microbienne représente un groupe de micro-organismes occupant un même écosystème et possédant éventuellement des fonctions et activités différentes les uns des autres. Une population microbienne représente l'ensemble des individus de même espèce occupant un même écosystème. L'étude d'une communauté microbienne implique l'analyse de divers aspects indispensables à la compréhension du fonctionnement de l'écosystème (**Figure 2.1**). Cependant, même si toutes les données ne sont pas accessibles, il est possible de

faire une approximation à partir des connaissances actuelles, de l'analyse des paramètres physico-chimiques de l'environnement et de la description de la diversité de la communauté microbienne présente dans le système.

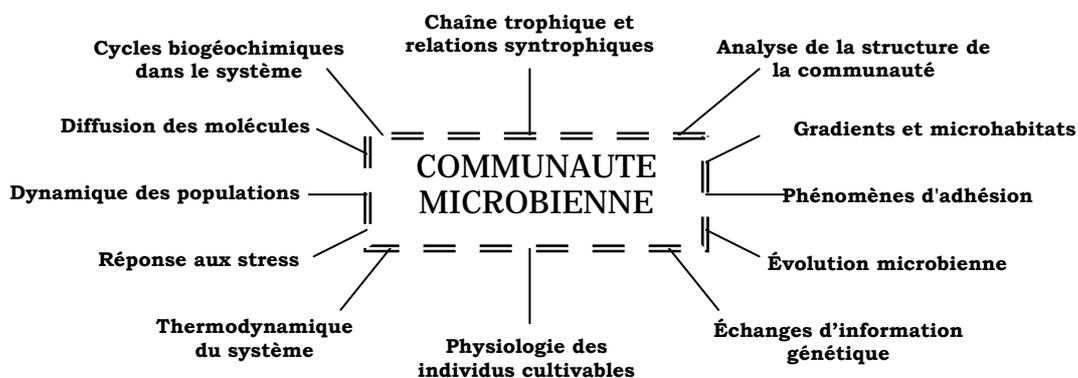


Figure 2.1. Principaux aspects à étudier pour comprendre le fonctionnement d'une communauté microbienne

2.2. L'étude de la diversité microbienne

La diversité d'une communauté microbienne est traditionnellement analysée par deux méthodologies différentes, la **Microbiologie Classique** et la **Microbiologie Moléculaire**.

2.2.1. L'identification microbienne en microbiologie classique

La structure des communautés microbiennes naturelles a pendant de nombreuses années été étudiée par des méthodologies reposant sur l'isolement et la culture des micro-organismes. Cette approche, nommée "**Microbiologie classique**", a généré la plupart de nos connaissances actuelles sur les micro-organismes, que ce soit dans les domaines de la physiologie microbienne ou de la génétique. Elle a permis le développement des outils de biologie moléculaire. Elle est basée sur la capacité des micro-organismes à croître sur des milieux synthétiques en fonction des conditions physiques et nutritionnelles du milieu. Elle passe généralement par une étape d'isolement de cultures pures qui est parfois précédée par une phase d'enrichissement pour favoriser la croissance d'un type donné de micro-organismes. Les souches pures

microbiennes isolées sont alors identifiées sur la base de leurs propriétés phénotypiques, physiologiques, voie biochimiques.

Avec le temps, il s'est avéré que cette approche comporte plusieurs limites. La limitation majeure est que seules certaines bactéries se développent sur milieu artificiel et nous donnent des informations relatives à leur métabolisme et structure génétique. Une autre limitation réside dans le fait que seules les souches pures peuvent être utilisées pour les tests d'identification physiologiques et biochimiques. Il n'est pas possible de connaître l'activité spécifique d'un seul groupe microbien dans un mélange complexe comme un écosystème microbien.

Les données actuelles suggèrent que les micro-organismes cultivés ne représentent qu'une petite fraction de la diversité microbienne par rapport à l'abondance des espèces présentes dans l'environnement (von Wintzingerode *et al.*, 1997). Seulement 1 à 15 % des bactéries seraient cultivables aujourd'hui (**Tableau 2.1**) (Staley et Konopka, 1985 ; Roszak et Colwell, 1987 ; Ward *et al.*, 1990 ; Amann *et al.*, 1995).

Tableau 2.1. Cultivabilité des bactéries de divers habitats (Amann *et al.*, 1995).

Habitat	Cultivabilité (%) ^a
Eau de mer	0,001-0,1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1-1
Eaux d'estuaires non pollués	0,1-1
Boues activées	1-15
Sédiments	0,25
Sol	0,3

a. Elle a été déterminée comme le pourcentage d'unités formant des colonies (bactéries cultivables), par rapport au nombre de cellules totales dénombrées par comptage direct au microscope.

Le faible taux de culture d'une espèce microbienne peut dépendre de plusieurs facteurs :

- soit le milieu où les conditions de culture ne sont pas adéquats. Il est parfois très difficile de reproduire les paramètres de l'environnement.
- soit l'espèce ne peut pas se développer seule. Elle vit en symbiose ou en relation syntrophique avec une autre espèce.
- soit elle se trouve à l'état de dormance ou dans un état viable mais non cultivable (Roszak et Colwell, 1987). Les cellules ont alors perdu leur aptitude à se multiplier sur un milieu donné mais elles présentent toujours une activité cellulaire et peuvent redevenir cultivables sous certaines conditions (Xu *et al.*, 1982 ; Roszak *et al.*, 1984). Dans le cas des micro-organismes pathogènes, les formes viables non cultivables et les phénomènes de retour à la cultivabilité peuvent prendre une dimension particulière liée au pouvoir pathogène des cellules revivifiées.

2.2.2. La phylogénie moléculaire

L'identification des micro-organismes par les méthodes moléculaires est apparue dans les années 1960-1970 suite au développement des outils de biologie moléculaire et aux progrès effectués en phylogénie moléculaire (Zuckerland et Pauling, 1965). La biologie moléculaire a permis d'avoir accès aux gènes et à leur séquence nucléotidique, notamment par l'amplification ciblée d'ADN *in vitro* par PCR. **La phylogénie moléculaire** a permis d'analyser ces séquences pour déterminer leur lien de parenté et reconstruire des arbres évolutifs des êtres vivants. Le concept de phylogénie moléculaire, développé par (Zuckerland et Pauling, 1962), utilise les molécules comme des marqueurs de l'histoire évolutive des êtres vivants. Il s'appuie sur la **théorie de l'horloge moléculaire** qui considère que des mutations s'accumulent au cours du temps dans le génome des êtres vivants et que le taux d'accumulation est dicté par l'intensité de la pression de sélection. Elle suppose que :

- 1) **Le taux d'accumulation des mutations** dans le génome d'organismes différents est du même ordre de grandeur dans des régions homologues (régions soumises à la même pression de sélection).
- 2) **L'accumulation des mutations est maximale** pour des régions qui ne sont pas soumises à la pression de sélection naturelle (séquences **non codantes**) **et minimale** dans les parties du génome soumises à une forte pression (c'est-à-dire, les **régions codant** pour des fonctions essentielles à la survie de l'organisme).

Woese et ses collaborateurs (1977) appliquèrent cette théorie à l'étude de la phylogénie bactérienne en utilisant l'**ADN codant** pour l'ARN ribosomique comme marqueur de l'évolution (Woese et Fox, 1977). Dans un premier temps, cette approche a été appliquée aux isolats bactériens pour permettre de compléter la caractérisation phénotypique des espèces par une caractérisation génotypique permettant ainsi la mise en place d'une taxonomie bactérienne plus fiable (Christen et Ruimy, 1996). Ces travaux ont conduit à la définition de séquences "signatures génétiques" qui sont des régions de la séquence de l'ADN ribosomique qui sont spécifiques de chaque groupe microbien. Ces travaux ont finalement permis de classer le monde vivant en trois grands domaines (*Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya*) (Woese *et al.*, 1990).

Rapidement les approches moléculaires se sont imposées car elles permettent non seulement d'identifier rapidement une bactérie déjà connue, mais aussi de reconnaître aisément une nouvelle bactérie, ou également de décrire la diversité microbienne d'un échantillon sans passer par une étape de culture. Elles surmontent les limites de la culture en apportant un gain de temps et en éliminant les biais dus à l'isolement.

2.2.2.1. L'ARNr comme marqueur pour identifier les micro-organismes.

L'émergence des technologies moléculaires en écologie microbienne est liée au développement de la **phylogénie moléculaire** à la fin des années soixante (Zuckerland et Pauling, 1965) ainsi qu'au choix de l'**ARN ribosomique 16S comme marqueur** évolutif à la fin des années soixante-dix (Woese et Fox, 1977). Même s'il existe d'autres gènes marqueurs utilisés, l'ARNr 16S est actuellement la séquence la plus utilisée pour les analyses de phylogénie microbienne. Pourtant, le choix des séquences à comparer a été pendant longtemps problématique car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet pour comparer des micro-organismes très éloignés il faut utiliser un domaine nucléique ou protéique qui reste sensiblement conservé pendant des centaines de millions d'années ou plus, tandis que la comparaison d'espèces proches requiert un domaine où des mutations se sont accumulées en quelques millions d'années ou moins.

La solution à ce problème est apparue avec la comparaison des séquences **d'ARN ribosomiques (ARNr)** qui possèdent toutes les qualités requises (Woese et Fox, 1977 ; Woese *et al.*, 1990) :

- 1) Leur présence est universelle car les ARNr sont des éléments clés dans la synthèse des protéines, donc d'un point de vue fonctionnel et évolutif, elles sont homologues chez tous les organismes.
- 2) Leur fonction est conservée et elles fournissent suffisamment d'information dans leur séquence pour permettre des comparaisons statistiquement significatives.
- 3) La pression de sélection qui s'exerce sur elles est peu dépendante des variations du milieu extérieur.
- 4) Elles sont constituées d'une alternance de domaines variables (spécifiques à chaque espèce) et de domaines conservés (spécifiques à des groupes d'espèce de plus en plus larges).

Parmi les ARNr présents dans l'opéron *rrn* (5S, 16-18S, 23-28S) (**Figure 2.2**), l'ARNr 16-18S s'est imposé comme la molécule de référence. La détermination de la filiation d'un organisme implique actuellement une étude phylogénétique de ses séquences d'ARNr 16S chez le procaryotes ou 18S chez les eucaryotes (Christen et Ruimy, 1996).

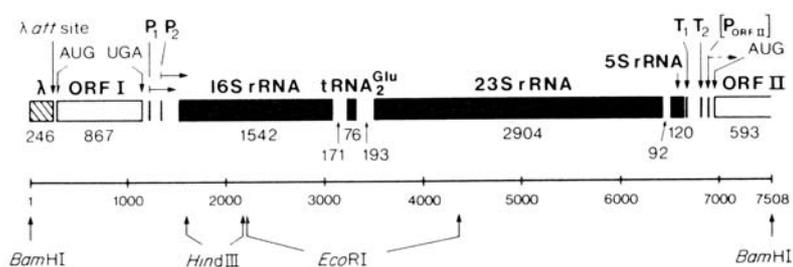


Figure 2.2. Carte schématique de l'organisation du gène *rrn* de la région B d'*E. coli* (Brosius *et al.*, 1981). Les séquences des gènes ribosomiques sont indiquées en noir, leur nom apparaît au dessus et leur taille en dessous des séquences. L'échelle indique la taille de la région. Les sites de restriction de *Bam*HI, *Hind*III et *Eco*RI sont montrés en bas de la carte. ORF = Open Reading Frame ou phase ouverte de lecture.

2.2.3. Construction d'arbres phylogénétiques

L'**arbre phylogénétique** présente les relations de parenté entre les organismes vivants. Il montre qui est proche de qui, et non pas qui descend de qui.

La construction de l'arbre est fondée sur l'analyse de nombreux caractères chez les espèces qu'il présente. Ces caractères peuvent être des séquences d'acides aminés

ou d'ADN (ribosomiques ou de gènes du métabolisme) ou des caractères phénotypiques. Dans tous les cas, il convient de définir des homologies entre les organismes à comparer, puis de réaliser une phylogénie à partir des caractères homologues. On considère que des caractères sont homologues quand ils dérivent d'un même caractère ancestral. Dans le cas de séquences nucléotidiques (ou d'acides aminés), la première étape de la construction de l'arbre consistera donc à faire un **alignement des séquences étudiées** pour mettre en regard les nucléotides (ou acides aminés) présents sur chaque séquence à des positions homologues. Une fois l'alignement obtenu il faudra choisir quelles positions sur la séquence sont informatives pour l'étude. Pour cela, on regardera les régions conservées qui vont donner une homologie primaire où chaque caractère différent sera transformé en distance pendant la construction de l'arbre phylogénétique. Ces transformations de caractères seront représentées par la longueur des branches de l'arbre. L'extrémité de chaque branche correspondra à un taxon (phylotype).

Il existe deux types de méthodes statistiques pour la **construction des arbres** phylogénétiques : *i) les méthodes basées sur les mesures de distance* entre les séquences et *ii) les méthodes basées sur les caractères* des séquences.

2.2.3.1. Construction d'arbres phylogénétiques par les méthodes fondées sur les distances

Les méthodes fondées sur les mesures de distance (Fitch et Margoliash, 1967) sont des méthodes de reconstruction d'arbre phylogénétique sans racine basées sur des critères de similarité. Les séquences sont comparées deux à deux pour trouver les phylotypes ou OTUs (Operationnal Taxonomic Unit, le plus souvent équivalent à une séquence) les plus proches et ceci à chaque étape de regroupement. Les distances évolutives mesurent le nombre de substitutions de caractères (nucléotides ou acides aminés) entre les séquences et ne cherchent pas à établir des relations d'ancestralité.

Ces méthodes sont rapides et donnent de bons résultats pour des séquences ayant une forte similarité. L'inconvénient majeur est la sensibilité de la méthode à des taux de mutation différents sur les différentes branches de l'arbre. D'autre part, si le temps de divergence entre deux séquences augmente, la probabilité d'avoir une seconde mutation à un site augmente également. Ceci fait que le simple comptage des différences entre deux séquences n'est pas le reflet exact de la réalité mais sous-estime le nombre d'événements mutationnels. Des algorithmes de calcul ont été

développés pour tenter de minimiser ces biais en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases ou acides aminés se sont substitués à un locus donné : **La correction de (Jukes et Cantor, 1969)** se base sur l'hypothèse que tous les sites sont équivalents, que tous les changements ont une probabilité égale, qu'il n'y a pas de biais dans la direction du changement et qu'il n'y a eu ni insertions, ni délétions. **La méthode du plus proche voisin (Neighbor-Joining)**, développée par (Saitou et Nei, 1987), autorise un taux de mutation différent sur les branches de l'arbre. L'arbre est obtenu par une approximation de l'arbre d'évolution minimale, celui dont la somme des longueurs des branches est minimale.

2.2.3.2. Construction d'arbres phylogénétiques par les méthodes fondées sur les caractères

Les méthodes fondées sur les caractères sont très lentes mais elles sont précises. Elles évaluent le nombre de mutations (substitutions / insertions / délétions) qui affectent chacune des positions des séquences étudiées et recréent leurs séquences ancestrales les plus probables.

La parcimonie (Fitch, 1971), fondée sur le principe de l'économie, consiste à minimiser le nombre de "pas" (mutations / substitutions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre dans une topologie de l'arbre jusqu'à obtenir l'arbre le plus parcimonieux. L'arbre définitif sera celui qui présentera le moins de mutations pour passer d'une séquence à une autre. Les nœuds qui relieront deux séquences correspondront à une séquence ancestrale déterminée à partir de la séquence de ses descendants. Pour arriver à cela, cette méthode s'appuie sur les hypothèses suivantes :

- 1) Les sites évoluent indépendamment les uns des autres (la séquence peut être considérée comme une suite de caractères non ordonnés).
- 2) La vitesse d'évolution est lente et constante au cours du temps.

A partir de l'alignement global, un nombre réduit de sites informatifs est utilisé pour construire des arbres. En théorie, les différentes topologies de ces arbres devraient être testées et l'arbre le plus parcimonieux conservé. Cependant, le maximum de parcimonie recherchant l'arbre optimal, il est possible de trouver plusieurs arbres optimaux. La détermination du meilleur arbre possible, nécessiterait l'évaluation de toutes les topologies possibles mais cela devient irréalisable lorsque l'on a plus de 12 séquences. Dans ce cas là, un **arbre consensus** va être créé à partir des nœuds les plus fréquemment rencontrés sur l'ensemble des arbres possibles. La robustesse de

cet arbre consensus pourra être statistiquement évaluée par tirage aléatoire des séquences à analyser et par reconstruction successive des arbres (**bootstrapping**).

Une autre méthode, le **maximum de vraisemblance** (Felsenstein, 1981), évalue en termes de probabilité, l'ordre des branchements et la longueur des branches d'un arbre sous un modèle évolutif donné. Les éventuelles mutations sont calculées pour chaque site et nœud de l'arbre de telle manière que tous les nucléotides possibles soient testés pour évaluer la probabilité que la séquence observée soit générée avec une longueur de branche donnée. La méthode assigne une séquence ancestrale à chaque nœud. Cette méthode est très longue et les ordinateurs actuels ne supportent pas des calculs de ce type au delà d'une centaine de séquences.

2.3. L'analyse de la diversité microbienne

2.3.1. L'analyse des trois domaines du monde vivant

Le développement des outils moléculaires d'identification des micro-organismes a permis d'aborder un nouveau champ d'investigation, celui de l'évolution des bactéries et de **l'écologie microbienne moléculaire**. La première conséquence de ces outils a été le découpage du monde du vivant en 3 domaines¹ (**Fig. 2.3**) (Wheelis *et al.*, 1992).

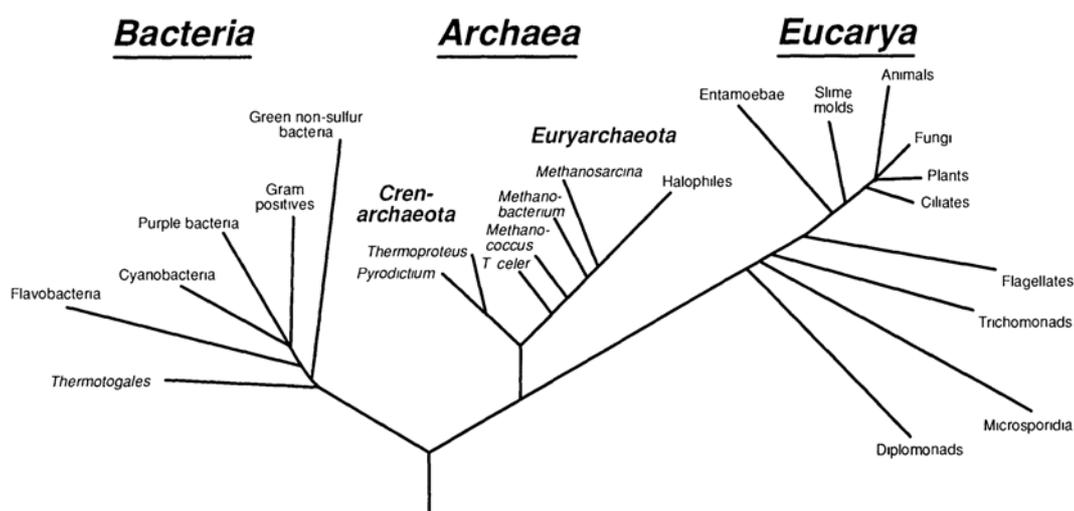


Figure 2.3. Arbre phylogénétique des trois domaines du monde vivant formé à partir des séquences d'ADNr 16-18S.

¹ Le plus haut taxa du monde vivant est le « Domaine ».

Cet arbre du monde vivant a été construit à partir de 30.000 séquences répertoriées dans les bases de données. Parmi elles, uniquement 5000 appartiennent à des micro-organismes isolés.

Les premiers travaux d'écologie microbienne moléculaire ont été effectués par l'équipe de Woese et Pace pour accéder à la diversité présente dans des échantillons environnementaux (Olsen *et al.*, 1986 ; Pace *et al.*, 1986). **Dans le domaine des bactéries**, ils ont identifié 11 divisions² basées sur les séquences de l'ADNr 16S. Cette découverte a été si extraordinaire que dans un peu plus d'une décennie le nombre des divisions reconnues et putatives de bactéries est passé à 36 (Woese, 1987). Une illustration de cette découverte explosive est la division *Acidobacterium*. Dans les deux ans après sa désignation, 250 séquences ont été publiées qui définissent au moins huit subdivisions (Bull *et al.*, 2000). De même, dans une étude remarquable sur la diversité microbienne de l'eau de la source chaude Obsidian Pool du Parc National Yellowstone (Etats-Unis), Pace et ses collègues ont défini **six nouvelles divisions** putatives (Hugenholtz *et al.*, 1998). Des séquences de micro-organismes appartenant à l'une d'elles (la division OP11) ont depuis été trouvées dans le sol, des sédiments et des écosystèmes aquatiques souterrains profonds. Cependant, parmi les 36 divisions de bactéries reconnues à ce jour, plus d'un tiers ne contiennent aucun organisme cultivé et seulement un tiers font l'objet de projets de séquençage génomique (Pace, 1997).

La connaissance de la diversité dans le **domaine Archaea** a aussi été augmentée. L'arbre phylogénétique *Archaea*, qui présentait **deux divisions principales** (*Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*), s'est récemment enrichi d'une **troisième**, la *Korarchaeota*, proposée sur la base de l'analyse des séquences d'ADNr d'organismes non cultivés trouvés dans le site d'Obsidian Pool (Barns *et al.*, 1996). Ainsi, le domaine *Archaea* qui était formé principalement par des organismes extrémophiles (hyper thermophiles, halophiles extrêmes ou anaérobies stricts), contient maintenant des micro-organismes détectés dans des environnements marins aérobies, des eaux douces et dans des sédiments marins (Massana *et al.*, 1997 ; Munson *et al.*, 1997).

² Une division phylogénétique est formée par deux ou plusieurs séquences d'ADN 16S qui sont monophylétiques et non affiliées avec tous les autres niveaux de division des groupes apparentés (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Enfin, dans le **domaine Eucarya**, la diversité observée est en constante augmentation. Ne serait-ce que pour le groupe des protozoaires par exemple, environ 360 nouvelles espèces sont décrites annuellement (Bull *et al.*, 2000).

2.3.2. Biais et limitations méthodologiques des études d'écologie microbienne moléculaire

L'analyse de la diversité d'une communauté microbienne obtenue à partir des méthodes moléculaires peut être limitée par des biais méthodologiques présents à chaque étape de l'analyse (von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Les écosystèmes microbiens sont normalement très hétérogènes dans le temps, l'espace et dans leurs génotypes (Wimpenny, 1993). Cette trilogie forme **les gradients** d'un écosystème³ qui peuvent provoquer des **biais à la collecte**, au stockage ou lors du traitement des échantillons et donner une mauvaise représentativité des populations de la communauté microbienne.

Pendant l'extraction de l'ADN d'un échantillon, une **lyse cellulaire insuffisante ou différentielle** peut changer la composition de la diversité et de l'abondance de l'ADN ou de l'ARN de l'échantillon. L'optimisation de cette étape est très importante pour l'analyse des communautés microbiennes. Les différentes structures des parois cellulaires posent problème car les conditions de lyse optimale des cellules Gram positives peuvent conduire à la fragmentation des acides nucléiques des cellules Gram négatives. Cette fragmentation augmente le risque d'apparition d'artefacts pendant la PCR qui vont contribuer à la formation de chimères (von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Les caractéristiques des génomes représentent un autre biais possible car il existe un nombre différent d'opéron des gènes ARNr (*rrn*) dans le génome de chaque espèce ou même entre les différentes souches d'un même espèce (Johansen *et al.*, 1996). Donc, si une espèce non cultivable possède 10 opérons *rrn*, son abondance sera biaisée par dix.

Les méthodes utilisant la PCR doivent prendre en considération les biais liés à cette technique pour l'analyse des données. Les principaux biais de cette technique sont **1)** l'amplification non spécifique, **2)** l'amplification préférentielle. Une molécule d'ADN très

³ Les gradients se classifient en stratifié, zoné, radial et irrégulier (Wimpenny, 1993).

nombreuse sera amplifiée 10^{+2} fois plus qu'une espèce qui a une seule copie de l'opéron *rrn*, et **3)** la création de séquences recombinantes ou chimères.

Les méthodes de reconstruction d'arbre phylogénétique sont basées sur des hypothèses dont certaines, comme la théorie de l'horloge moléculaire, peuvent être remises en cause. En effet, **1)** L'horloge moléculaire pourrait ne pas être constante si les mutations avantageuses se fixent plus rapidement lors de la formation de nouvelles espèces, et **2)** L'horloge moléculaire serait épisodique ; les mutations ne se produiraient pas de façon indépendante au cours de l'évolution car il y aurait des épisodes d'accumulation suivis d'arrêts évolutifs.

Enfin d'une manière générale, il existe deux autres grandes limitations liées aux approches de caractérisation moléculaire des communautés microbiennes :

- Elles permettent de classer et d'identifier les séquences par leur positionnement dans un groupe phylogénétique réunissant des organismes qui partagent des caractères phénotypiques, mais elles ne donnent souvent aucune idée sur la fonction de l'organisme correspondant dans le système. Les seules exceptions sont les bactéries nitrifiantes autotrophes et les *Archaea* méthanogènes qui jusqu'à ce jour forment des groupes phylogénétiques et fonctionnels discrets et totalement superposables.
- Elles ne permettent pas de déterminer si le micro-organisme correspondant à une séquence est réellement actif dans l'écosystème ou s'il est en transit ou même en train de mourir.

CHAPITRE 3

Les déjections animales : une communauté microbienne en transit

Sur un plan microbiologique, les déjections animales représentent une communauté microbienne en transit qui voyage au travers de plusieurs environnements. Formée dans le tube digestif de l'animal, elle va s'adapter aux conditions extérieures après excrétion pour donner de nouveaux écosystèmes. Dans le cas qui nous intéresse, les conditions extérieures seront les lisiers ou les fumiers. Ce chapitre a pour objectif de faire le point sur les connaissances actuelles concernant ces différents écosystèmes.

3.1. L'écosystème du tube digestif porcin

L'écosystème du tube digestif est un ensemble dynamique au sein duquel interagissent à divers degrés des facteurs biotiques et abiotiques (Stewart, 1997) :

- **Les composants biotiques** sont les micro-organismes établis à demeure ou en transit et les cellules du tractus gastro-intestinal de l'hôte qui délimitent le biotope. Tous les animaux vivent en équilibre avec une masse énorme de micro-organismes, environ **10¹⁴ bactéries**, qui habite dans les cavités de leur tube digestif, et que l'on appelle la flore Intestinale (Ducluzeau et Raibaud, 1994 ; Ducluzeau, 1997).
- **Les composants abiotiques** sont constitués par les aliments, en particulier ceux ayant résisté à la digestion durant leur passage dans l'intestin grêle, des composés endogènes provenant de la salive, des sécrétions et excréctions gastriques, pancréatiques, hépatiques, intestinales, et enfin des cellules résultant du renouvellement de la muqueuse. Les sécrétions et les excréctions causent un changement de pH tout au long du tube digestif. L'environnement physique est caractérisé par l'absence d'oxygène (sauf dans l'estomac) et une température mésophile (Ducluzeau et Raibaud, 1994 ; Ducluzeau, 1997).

3.1.1. La flore du tube digestif porcine

Le tractus gastro-intestinal du porc est un écosystème microbien amplement étudié par des méthodes de microbiologie classique et moléculaire (**Figure 3.1**) (Kenworthy, 1973 ; Salanitro *et al.*, 1977 ; Fuller *et al.*, 1978 ; Russell, 1979 ; Moore *et al.*, 1987 ; Henriksson *et al.*, 1995 ; Ducluzeau, 1997 ; Lin *et al.*, 1997 ; Stewart, 1997 ; Pryde *et al.*, 1999 ; Simpson *et al.*, 2000 ; Leser *et al.*, 2002).

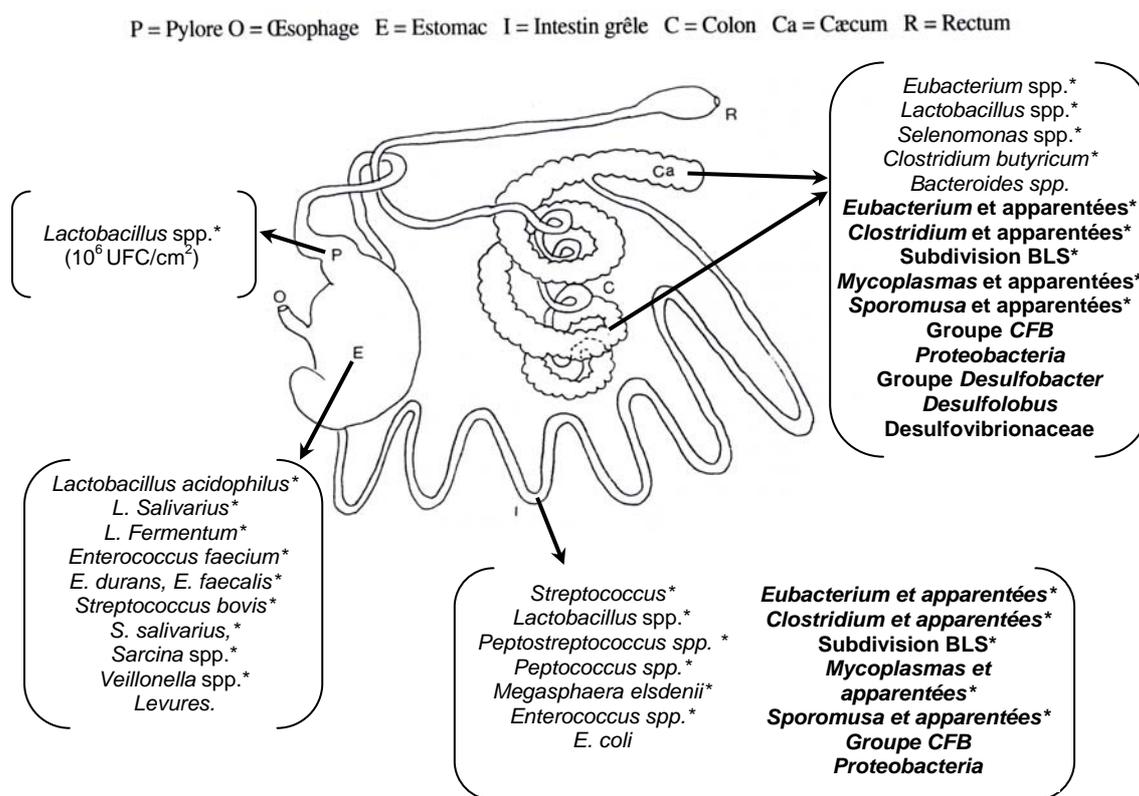


Figure 3.1. Schéma du tractus gastro-intestinal du porc, de l'estomac au rectum, et distribution de la flore microbienne détectée par des méthodes de microbiologie classique ou moléculaire (caractères gras) nommés selon le Ribosome Database Project II (Maidak *et al.*, 2001). BLS = *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* ; CFB = *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. (*) indique les bactéries Gram positives à haut GC %.

La flore du tube digestif porcine est relativement riche, surtout au niveau de l'estomac. **L'estomac** est composé de deux zones : *i*) une zone sécrétrice d'acide chlorhydrique (HCl) peu colonisée du fait de l'acidité qui y règne. Malgré ces conditions, elle abrite une population de *Lactobacillus* sp. (10^4 à 10^6 UFC/cm² de l'estomac) (Henriksson *et al.*, 1995) ; et *ii*) une zone supérieure non sécrétrice fortement colonisée par les micro-

organismes (**10⁹ bactéries/gramme du contenu de l'estomac**) (Ducluzeau, 1997). Dans ce dernier la microflore est dominée par la présence de bactéries Gram positives anaérobies facultatives et spécialement de bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*.

Les mêmes groupes microbiens sont retrouvés au niveau de l'**intestin grêle**, du duodénum et de l'iléon mais la concentration bactérienne y est plus faible (**10⁷ bactéries/gramme**) car la vitesse de transit du bol alimentaire empêche leur accumulation.

Au niveau du **caecum et du colon** le transit digestif est plus lent que dans les autres parties du tractus ; ce sont les deux segments intestinaux hébergeant le plus grand nombre de micro-organismes (de l'ordre de **10¹¹ bactéries/gramme**). La communauté bactérienne dominante est constituée de bactéries anaérobies strictes comme *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus* et *Peptostreptococcus*.

Récemment, (Leser *et al.*, 2002) ont réalisé un inventaire moléculaire très complet du **tractus gastro-intestinal du porc** avec environ **4200 séquences** d'ARNr 16S analysées à partir de 5 prélèvements effectués sur 24 porcs d'âge différent. Sur la base de 97 % de similarité de séquence, ils ont recensé **375 phylotypes** dont 83 % ne présentent pas de forte homologie avec des séquences déjà connues. 81 % de leurs phylotypes appartiennent aux bactéries **Gram positives à bas GC %** et 11 % aux groupes *Bacteroides* et *Prevotella* (**Tableau 3.1**).

Aucune étude de la diversité **Archaea et Eucarya** n'a été faite sur le tractus intestinal du porc.

En conclusion, l'étude de l'écosystème bactérien **du tube digestif porcin** laisse apparaître une grande diversité dominée par les bactéries à **Gram positif à bas GC%**. Plusieurs familles génétiques sont fréquemment retrouvées : *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, et les Entérobactéries. D'autres genres bactériens ont été mis en évidence mais plus ponctuellement : *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Selenomonas*, *Sporobacter*, *Veillonella*, *Megasphaera*, *Desulfovibrio*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Treponema* (Robinson *et al.*, 1981 ; Varel *et al.*, 1995 ; Whitehead et Cotta, 1999 ; Zhu et Jacobson, 1999 ; Cotta *et al.*, 2003 ; Aubry-Damon *et al.*, 2004).

Tableau 3.1. Affiliation phylogénétique des séquences de *Bacteria* trouvées dans l'inventaire moléculaire du tractus digestif de porcs (Leser *et al.*, 2002).

Groupe Phylogénétique ^a	Numéro de RDP (registration)	Nombre de phylotypes	Similarité moyenne (%) ^b
BACTERIA			
Bactéries Gram positives à bas GC %			
<i>Eubacterium</i> et apparentées	2.30.4	125	93
<i>Clostridium</i> et apparentées	2.30.9	109	92,2
Subdivision <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>	2.30.7	46	96,7
<i>Mycoplasma</i> et apparentées	2.30.8	8	78,6
<i>Sporomusa</i> et apparentées	2.30.3	15	94,7
Groupe <i>Clostridium purinolyticum</i>	2.30.5	1	94,4
Groupe <i>Flexibacter-Cytophaga- Bacteroides</i>	2.15	42	87,5
Spirochetes et apparentées	2.27	2	86,4
Proteobacteria	2.28	20	94,8
Bactéries Gram positives à haut GC %	2.30.1	4	93,5
<i>Planctomyces</i> et apparentées	2.20	1	86
Groupe <i>Anaerobaculum thermoterrenum</i>	2.11	1	84,3
Assemblage <i>Flexistipes sinusarabici</i>	2.14	1	85,9

a. Le groupe phylogénétique correspond au Ribosomal Data Base Project II (RDP-II).

b. La similarité moyenne correspond à la moyenne de la similarité de chaque phylotype par rapport à sa séquence la plus proche trouvée dans les bases de données.

3.1.2. La flore des fèces porcins

Concernant la diversité bactérienne des **fèces de porcs**, un **dénombrement** par comptage direct au microscope a montré que la flore totale varie entre 2,7 et $5,95 \times 10^{10}$ bactéries/g de fèces (Salanitro *et al.*, 1977).

En utilisant les **méthodes classiques d'isolement** et d'identification suivant les caractères phénotypiques, plusieurs auteurs ont décrit les flores présentes dans les **fèces de porcs**. (Salanitro *et al.*, 1977) a examiné la flore fécale des porcs adultes et

les genres bactériens prédominants ont été *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium* et *Propionibacterium*. D'autres études ont identifié une diversité bactérienne très similaire où les genres les plus abondants appartiennent aux **bactéries Gram positives à bas GC %** typiques des environnements intestinaux (**Tableau 3.2**). Les groupes les moins importants furent *Treponema*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Selenomonas*, *Lactobacillus* et *Escherichia* (Varel *et al.*, 1995 ; Whitehead et Cotta, 1999 ; Zhu et Jacobson, 1999 ; Cotta *et al.*, 2003 ; Aubry-Damon *et al.*, 2004).

Une étude moléculaire, très limitée par le nombre de séquences analysées (24 séquences d'ADNr), s'est consacrée à la communauté microbienne des **féces de porcs** (Whitehead et Cotta, 2001). Dans cette étude, la communauté microbienne est dominée par les **bactéries Gram positives à bas GC %** (*Clostridium* sp., *Streptococcus* sp. et *Lactobacillus* sp.) (**Tableau 3.2**).

Contrairement aux bactéries, les études concernant les **Archaea** dans les écosystèmes digestifs des animaux monogastriques sont peu nombreuses. Les **Archaea** retrouvées dans les **féces de porc** sont des méthanogènes hydrogénotrophes du groupe des **Methanobacteriaceae** et plus spécifiquement du genre **Methanobrevibacter** (Lin *et al.*, 1997 ; Chuzhao et Miller, 1998) (**Tableau 3.2**). Ces **Archaea** produisent du méthane à partir d'H₂ et de CO₂. Dans le rumen, qui a été utilisé comme modèle d'étude de ce type d'environnement, les **méthanogènes hydrogénotrophes** sont dominantes. Les **Archaea** acétotrophes, qui produisent du méthane à partir d'acétate, ne sont présentes qu'à une faible concentration (10⁴/mL de contenu de rumen), l'acétate produit au cours de la dégradation de la matière organique étant principalement absorbé par la paroi intestinale de l'hôte.

La diversité des **eucaryotes** dans les écosystèmes digestifs des animaux monogastriques est représentée par des eucaryotes unicellulaires comme les ciliés (Miller, 1991). La seule étude effectuée sur les **féces de porcs** sains avait pour but de tester la résistance aux antibiotiques des levures et présente par conséquent une diversité biaisée (Aubry-Damon *et al.*, 2004) (**Tableau 3.2**). Dans le rumen, les protozoaires et les champignons filamenteux sont nombreux bien qu'ils ne participent pas aux fermentations. Ils sont surtout des prédateurs des bactéries et des consommateurs de cellulose, respectivement (Miller, 1991).

Tableau 3.2. Diversité microbienne dans les fèces de porcs.

Nom systématique ou phylogénétique	Observation	Référence
Diversité des BACTERIA dans les fèces :		
Fermenteurs du lactose, <i>Clostridium</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., non fermenteurs du lactose, <i>Staphylococcus</i> sp. et Enterocoques.	Les genres ont été définis par rapport aux activités métaboliques.	Rall <i>et al.</i> , (1970) [In : (Zhu et Jacobson, 1999)]
<i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Peptostreptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> . et <i>E. coli</i> .	La plupart sont des coques Gram positives.	Nuru <i>et al.</i> , (1972) [In : (Zhu et Jacobson, 1999)]
Streptocoques fécaux, <i>Eubacterium</i> sp., <i>Clostridium</i> sp. et <i>Propionibacterium acnes</i>	Les groupes minoritaires ont été similaires à <i>Treponema</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Bacteroides</i> et <i>E. coli</i> .	(Salanitro <i>et al.</i> , 1977)
<i>Clostridium herbivorans</i>	Il a une activité cellulolytique.	(Varel <i>et al.</i> , 1995)
Enterococci, <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>Enterobacteria</i> , et <i>E. coli</i> .	Ils ont été testés par rapport à leur résistance aux antibiotiques.	(Aubry-Damon <i>et al.</i> , 2004)
<i>Clostridium coccooides</i> group (2.30.4.1) ^a , <i>C. botulinum</i> group (2.30.9.2), <i>Sporomusa</i> group (2.30.3.1), <i>Streptococci</i> (2.30.7.21), <i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group (2.30.8.2) et <i>Lactobacilli</i> (2.30.7.17).	Les espèces ont été cultivées et ensuite analysées par des méthodes moléculaires (24 séquences).	(Whitehead et Cotta, 2001 ; Cotta <i>et al.</i> , 2003) ^b
Diversité des ARCHAEA dans les fèces :		
<i>Methanobrevibacter</i> spp.	Les séquences analysées ont eu 99,3 % de similarité avec <i>M. smithii</i> .	(Chuzhao et Miller, 1998) ^b
Diversité des EUCARYA dans les fèces :		
<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Geotrichium</i> sp., <i>Rhodolulora</i> sp., et <i>Saccharomyces cerevesiae</i> .	Ils ont été testés par rapport à leur résistance aux antibiotiques.	(Aubry-Damon <i>et al.</i> , 2004)

a. Numéro du groupe défini par le Ribosomal Database Project II.

b. Etude réalisée avec des outils moléculaires.

3.2. Le fonctionnement du tube digestif porcin

La principale **fonction attribuée à la flore intestinale** est la dégradation des matières fermentescibles ingérées en composés facilement absorbables par les intestins pour produire de la biomasse microbienne et du biogaz (méthane et dioxyde de carbone). Cette dégradation s'effectue à travers une chaîne trophique nommée **digestion anaérobie** qui commence avec une étape **d'hydrolyse** des macromolécules

organiques en monomères plus simples. Ces monomères sont ensuite métabolisés par fermentation pour produire des alcools, des acides gras volatiles (AGV) ainsi que de l'hydrogène et du CO₂ ; c'est l'étape d'**acidogénèse**. Les produits de fermentation sont alors transformés en acétate pendant l'**acétogénèse**. Finalement, l'hydrogène et l'acétate seront utilisés pour produire du méthane (**méthanogénèse**) et du CO₂ (**Fig. 3.2**).

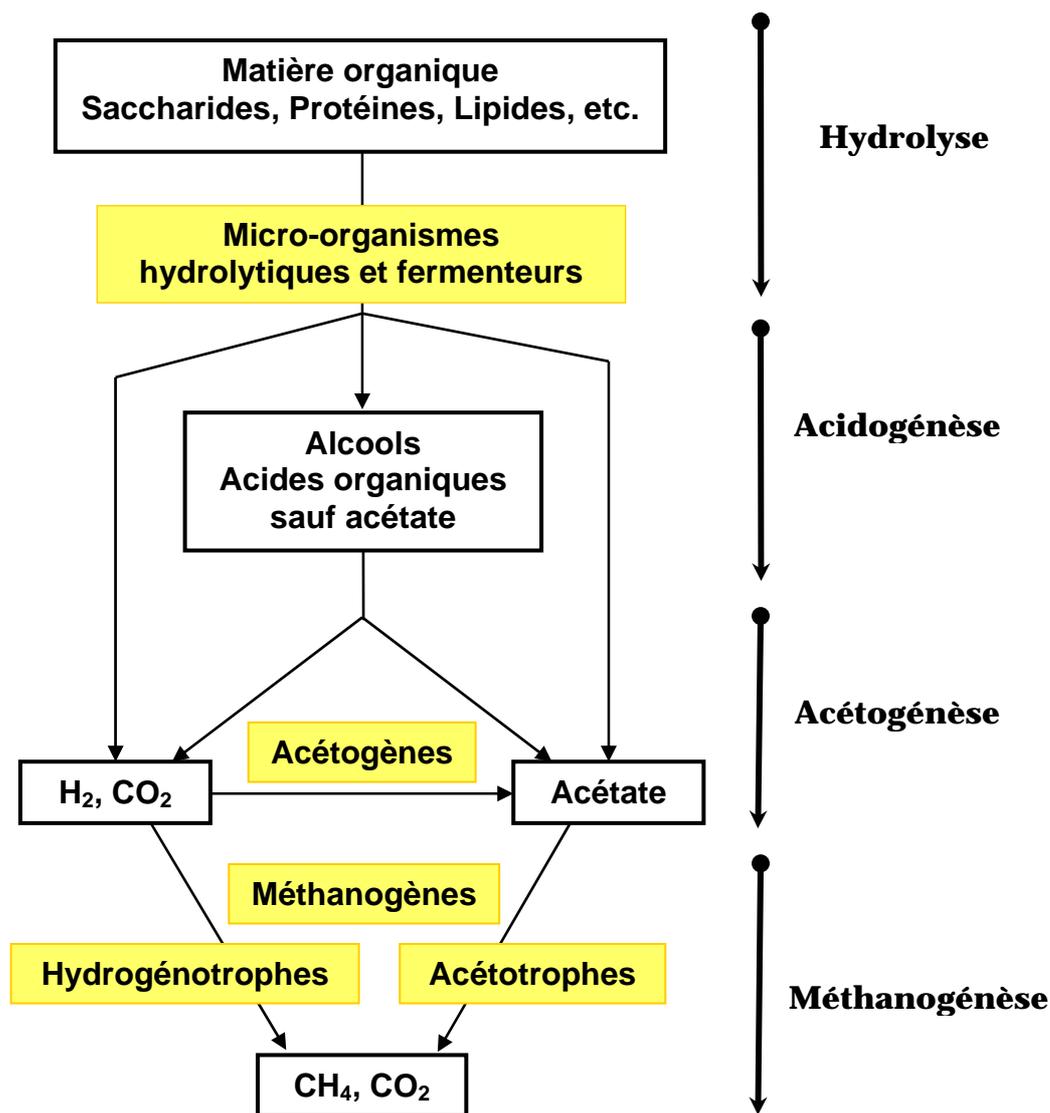


Figure 3.2. Schéma de la chaîne trophique de la digestion anaérobie et ses différentes étapes.

3.2.1. Etapes de la digestion anaérobie

Dans la digestion anaérobie chaque espèce de micro-organisme contribue à la simplification de la matière organique jusqu'à méthane et CO₂. Pendant **l'hydrolyse** les macromolécules comme les polysaccharides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont découpés, généralement par des enzymes spécifiques extracellulaires, jusqu'à l'obtention de leurs monomères (monosaccharides, acides gras, acides aminés et bases azotées) qui sont transportés à l'intérieur de la cellule où ils seront fermentés.

Les groupes microbiens impliqués sont :

- **Hydrolyse de lipides** : *Butyrivibrio* spp., *Eubacterium* spp., *Treponema* spp., *Borelia* spp. et *Ruminococcus* spp. (McInerney, 1988).
- **Hydrolyse de protéines** : *Bacteroides* spp., *Selenomonas* spp., *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp, *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Butyrivibrio* spp., *Streptococcus* spp., et *Lachnospira* spp.. Les *Archaea Thermofilum pendens*, *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus* spp. (McInerney, 1988).
- **Hydrolyse de la cellulose** : *Bacteroides* spp., *Butyrivibrio* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp., *Acetivibrio* spp., *Micromonospora* spp. et *Ruminococcus* spp.. Les champignons anaérobies *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis* et *Neocallimastix frontales*. Les eucaryotes unicellulaires ciliés *Diplodinium* spp. (Colberg, 1988).
- **Hydrolyse de la lignine** : *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp. et *Desulfovibrio* spp. (Colberg, 1988).

Pendant l'étape suivante, **l'acidogénèse**, ces monomères sont métabolisés par les micro-organismes fermentaires pour produire principalement des AGV (acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate et isovalérate) mais aussi des alcools, du sulfure d'hydrogène¹ (H₂S), des amines, du CO₂, et de l'hydrogène (**Figures 3.3, voir équations 1-6**) (Mackie *et al.*, 1998).

¹ L'H₂S est produit à partir du catabolisme de la cystéine et par la réduction dissimilatrice du sulfate.

Catabolisme de la cystéine :

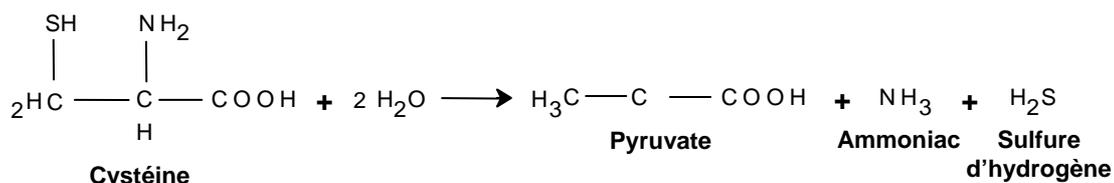


Figure 3.3. Voie du catabolisme de la cystéine conduisant à la production de pyruvate, d'ammoniac et de sulfure d'hydrogène. Les différents composés ne sont pas présentés dans leur forme majoritaire à pH=7.

Les bactéries qui participent à cette étape peuvent être anaérobies strictes ou facultatives avec un temps de duplication très court (30 minutes à quelques heures). La vitesse de cette étape est très élevée par rapport aux étapes suivantes où les micro-organismes ont un temps de duplication plus long. Les bactéries anaérobies strictes du **genre *Clostridium*** constituent souvent une fraction importante de la population anaérobie qui participe à l'étape d'acidogénèse, bien que d'autres groupes bactériens comme la famille des *Enterobacteriaceae* ou encore les genres *Bacteroides*, *Bacillus*, *Pelobacter*, *Acetobacterium* et *Ulyobacter* puissent être impliqués. Ces bactéries transforment le glucose en acétate, propionate et butyrate selon les réactions suivantes :



L'**acétogénèse** regroupe deux groupes bactériens distincts :

- **Le premier groupe** permet de transformer les produits de l'acidogénèse en acétate qui sera ensuite consommé par les *Archaea* méthanogènes acétotrophes. Cette étape produit aussi de l'hydrogène qui sera utilisé par les bactéries homoacétogènes et les *Archaea* hydrogénéotrophes (Dolfing, 1988 ; Drake, 1994). Les bactéries acétogènes transforment le propionate et le butyrate en acétate selon les réactions suivantes ² :



PROPIONATE

ACETATE

METHANE

ACIDE
CARBONIQUE

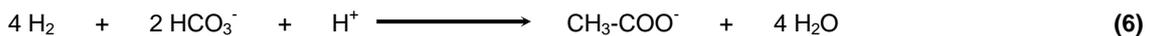
$$\Delta G^\circ = -102.4 \text{ kJ/mol}$$



BUTYRATE

$$\Delta G^\circ = -34 \text{ kJ/mol}$$

- **Le second groupe**, les bactéries **homoacétogènes**, utilisent l'hydrogène, le dioxyde de carbone et des centaines de saccharides comme le glucose et le fructose pour produire de l'acétate (Dolfing, 1988 ; Drake, 1994) :



$$\Delta G^\circ = -104.6 \text{ kJ/mol}$$

L'homoacétogénèse produit 27 % et 33 % du total de l'acétate présent dans le colon humain et dans l'intestin de termite, respectivement (Doré *et al.*, 1995).

Le nombre de bactéries acétogènes chez le porc s'élève à 10^5 micro-organismes /g de poids humide d'échantillon dans le caecum et le colon ; ce qui représente une proportion de bactéries acétogènes / bactéries anaérobies totales inférieures à 1/500 et 1/25 000, respectivement (Doré *et al.*, 1995). Parmi les **bactéries acétogènes**, on retrouve *Clostridium formicoaceticum*, *C. aceticum*, *Acetobacterium woodii* et *A.*

² Les deux équations présentant le CH₄ à droite montrent qu'il s'agit de la réaction réalisée par la coculture d'une bactérie OHPA (Obligated Hydrogen Producing Acetogen) et d'une bactérie méthanogène hydrogénéotrophe.

wieringae pour les homoacétogènes, ainsi que *Clostridium* spp., *Acetobacterium* sp., *A. malicum*, *Acetitomaculum ruminis*, *Acetoanaerobium noterae*, *Peptostreptococcus productus*, *Eubacterium limosum*, *Sporomusa* spp., *Syntrophococcus sucromutans* et plusieurs autres souches non identifiées (Dolfing, 1988 ; Drake, 1994).

La simplification de la matière organique se termine par l'étape de **méthanogénèse** où l'acétate et l'hydrogène sont utilisés pour produire du méthane et du dioxyde de carbone lorsqu'il n'y a pas d'autre accepteur d'électron exogène comme l'oxygène moléculaire, les nitrites, les nitrates et les sulfates. **La biosynthèse du méthane** se fait grâce à la participation d'un coenzyme porteur de groupes méthyles (le CoM) spécifique aux *Archaea* méthanogènes. Il existe deux voies de production du méthane:

- **Les *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes** ou hydrogénéophiles utilisent l'hydrogène produit en acétogénèse pour réduire le CO₂ en méthane selon la réaction suivante (Zehnder et Stumm, 1988) :

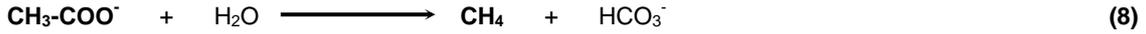


$$\Delta G^\circ = -136 \text{ kJ/mol}$$

Cette réaction a une double fonction, en éliminant l'hydrogène gazeux elle régule la production des AGV, surtout du butyrate, et contrôle les vitesses du catabolisme des acides propionique et butyrique (Zehnder et Stumm, 1988 ; Jackson et McInerney, 2002). Parmi **les méthanogènes hydrogénotrophes** on trouve *Methanobrevibacter* sp., *M. smithii*, *M. arboriphilicus*, *Methanospirillum hungatei* et *Methanobacterium formicicum* (Zehnder et Stumm, 1988 ; Miller, 1991 ; Garcia *et al.*, 2000). **Chez le porc**, (Lin *et al.*, 1997) ont montré, en utilisant des sondes moléculaires d'ARNr 16S des principaux groupes méthanogènes, que le groupe des ***Methanobacteriaceae***³ était dominant (**45 % du total**).

- **Les *Archaea* méthanogènes acétotrophes**, ou acétoclastes, effectuent la production de méthane à partir de l'acétate selon la réaction suivante (Dolfing, 1988 ; Drake, 1994) :

³ Les genres qui sont classés dans cette famille sont *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanobacterium* et *Methanoculleus*.



$$\Delta G^\circ = -31 \text{ kJ/mol}$$

Cette réaction, qui produit 73 % du méthane dans les systèmes anaérobies comme les digesteurs et les sédiments, n'est pas très importante dans les environnements intestinaux à cause de l'absorption de l'acétate par l'hôte (**Fig. 3.4**).

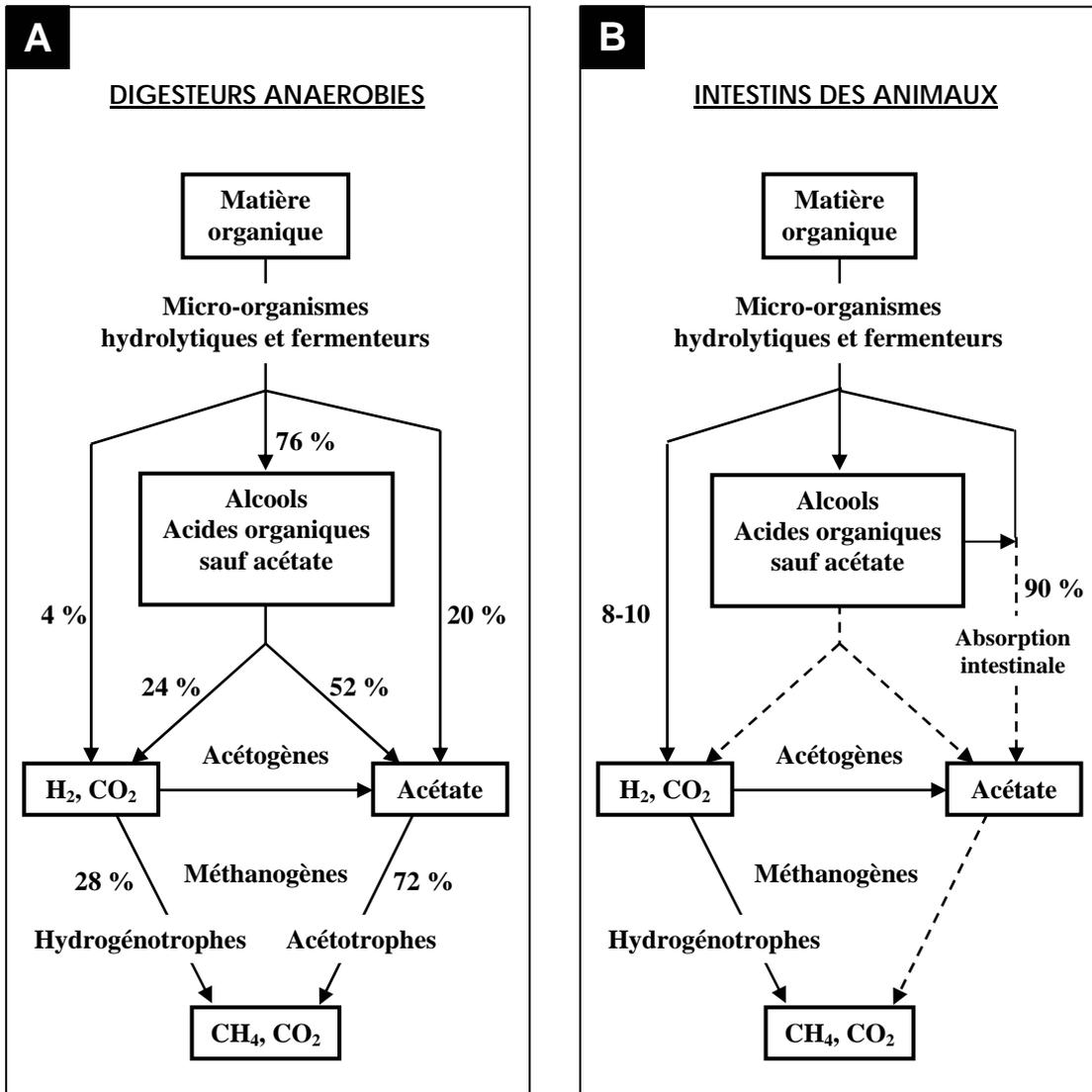


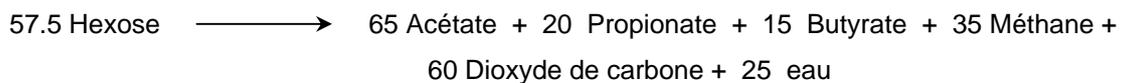
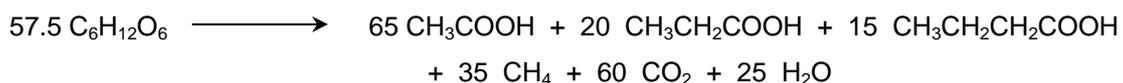
Figure 3.4. Schémas des systèmes anaérobies méthanogènes typiques des sédiments et digesteurs anaérobies (A), et typiques des environnements intestinaux et du rumen (Garcia *et al.*, 2000). Les pourcentages indiquent le flux de carbone dans la chaîne trophique. Les lignes en pointillés montrent une diminution des flux dans la chaîne trophique.

En effet, les **écosystèmes des tubes digestifs des animaux**, comme le rumen des bovins et des ovins, et le gros intestin des animaux monogastriques (l'homme et le porc), ne font pas une bioconversion complète des substrats jusqu'au CH₄ et CO₂ (**Tableau 3.3A**). Ils accumulent des acides gras volatils (AGV), surtout l'acétate, le propionate, et le butyrate qui sont très efficacement absorbés (90 %) par la muqueuse caeco-colique (Miller, 1991 ; Stewart, 1997). Dans ces environnements les principaux substrats de la méthanogénèse sont l'H₂ et le CO₂ (Robinson *et al.*, 1989 ; Miller, 1991).

Par contre, dans les digesteurs anaérobies industriels, qui font une bioconversion complète des substrats (**Tableau 3.3B**), les méthanogènes acétotrophes les plus courantes sont : *Methanosarcina thermofila*, *Methanosarcina mazei* et *Methanosaeta concilii*.

Tableau 3.3. Bioconversion anaérobie incomplète et complète d'un hexose (glucose) en méthane ^a (Miller, 1991).

A. Incomplète (Intestins et rumen) :



B. Complète (Digesteurs anaérobies et sédiments) :



a. Les différents composés ne sont pas présentés dans leur forme majoritaire à pH=7.

3.2.2. Les relations syntrophiques et les compétitions dans la digestion anaérobie

Dans un système aussi complexe que l'écosystème de digestion anaérobie, certaines molécules produites par le métabolisme des différentes populations microbiennes fonctionnent comme des **éléments régulateurs du système. Ces molécules sont essentiellement l'hydrogène (H₂) et les AGV** (en particulier l'acétate) et dans une certaine mesure le sulfate (Miller, 1991).

3.2.2.1. L'effet de l'hydrogène

Pendant l'acétogénèse, le propionate et le butyrate sont métabolisés en acétate, hydrogène et dioxyde de carbone par un groupe de bactéries nommées acétogènes productrices obligées d'hydrogène⁴. Ces bactéries sont inhibées par l'hydrogène qu'elles produisent car pour que ces réactions se fassent il faut que l'hydrogène produit par une espèce bactérienne soit consommé par une autre espèce bactérienne, ce qui baisse la pression partielle en hydrogène à un niveau où les réactions de conversion du propionate et du butyrate en acétate redeviennent thermodynamiquement favorables⁵. Ce phénomène est nommé transfert inter-espèces d'hydrogène ; il agit par inhibition des réactions d'oxydoréduction qui permettent le recyclage du coenzyme NADH/NAD⁺. La présence de méthanogènes hydrogénotrophes qui consomment l'hydrogène produit va permettre de lever cette inhibition. En raison de leur **dépendance mutuelle** les groupes microbiens acétogènes et méthanogènes impliqués sont mentionnés comme **syntrophiques**.

L'inhibition par l'hydrogène peut aussi changer la production métabolique de certaines bactéries fermentaires comme *Ruminococcus albus* dans le rumen. (**Fig. 3.5**) (Wolin, 1979 ; Miller, 1991).

⁴ Obligated Hydrogen Producing Acetogen, (OHPA), maintenant on sait qu'elles peuvent produire d'autres métabolites et la plupart d'entre elles ont été obtenues en culture pure sur certains substrats pour lesquels elles n'ont plus besoin de syntrophie avec un hydrogénotrophe.

⁵ Ces réactions deviendraient thermodynamiquement favorables en dessous de 3×10^{-5} et 6×10^{-5} atm d'hydrogène respectivement.

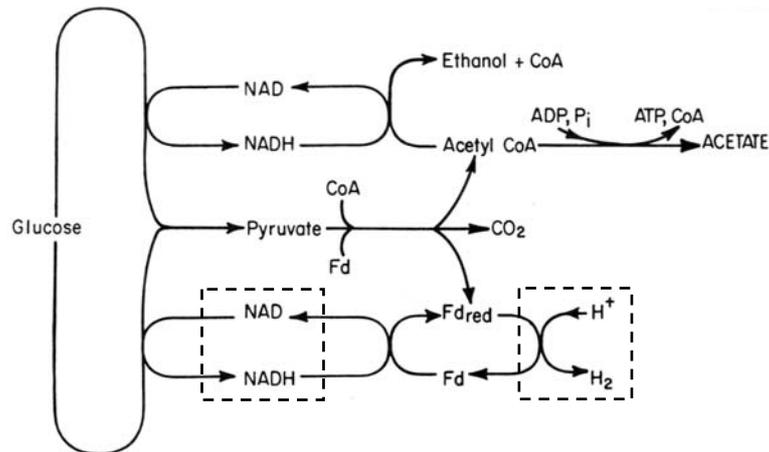


Figure 3.5. Fermentation du glucose par *Ruminococcus albus*. Les carrés en pointillés montrent la voie de ré-oxydation du NADH dans le rumen et la production d'hydrogène. Lorsque *R. albus* est cultivé seul, l'hydrogène s'accumule dans le milieu et inhibe la ré-oxydation du NADH. L'éthanol devient un produit important de la fermentation. Lorsque *R. albus* est cultivé en présence d'une *Archaea* méthanogène hydrogénotrophe, la voie de la production d'hydrogène est favorisée (Wolin, 1979).

En présence de méthanogènes hydrogénotrophes *R. albus* produit de l'H₂ et de l'acétate. Lorsqu'il est cultivé seul, l'hydrogène s'accumule dans le milieu et l'éthanol devient un produit important de la fermentation (Wolin, 1979).

3.2.2.2. L'effet de l'acétate

D'un point de vue thermodynamique, la production de méthane par la voie de l'acétate est énergétiquement défavorable si l'on considère les réactions étapes par étapes (**Fig. 3.6**). Cependant, l'ensemble de la chaîne devient favorable si le produit final (l'acétate) est métabolisé. Les *Archaea* méthanogènes acétotrophes, en consommant l'acétate produit en acétogénèse, vont créer une relation **syntrophique** avec les bactéries acétogènes (Schink, 1997 ; Kleerebezem et Stams, 2000 ; Jackson et McInerney, 2002).

Une étude réalisée par (Beaty et McInerney, 1989) a montré l'inhibition du catabolisme du butyrate par l'acétate (0,870 g/L) dans des co-cultures de *Syntrophomonas wolfei* et de l'*Archaea* méthanogène hydrogénotrophe *Methanospirillum hungatei*. L'introduction dans le système d'une méthanogène acétotrophe (*Methanosarcina barkeri*) a rétabli la dégradation du butyrate. Ce phénomène a été aussi observé avec *Clostridium*

ultunense, une bactérie homoacétogène isolée d'un réacteur traitant du lisier de porcs avec une concentration élevée en ammonium (Schnurer *et al.*, 1997).

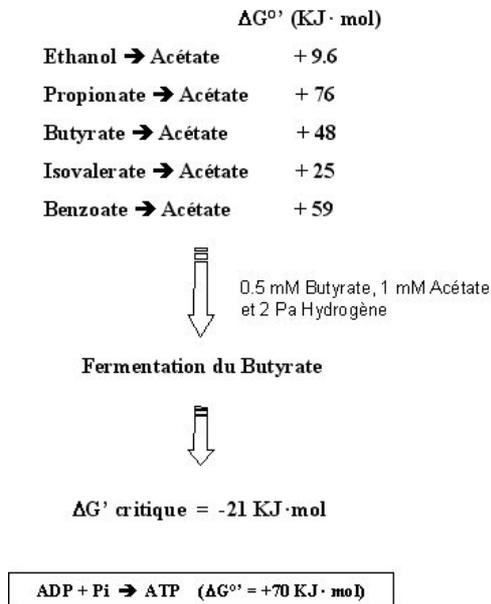


Figure 3.6. Aspects thermodynamiques des réactions d'acétogénèse dans un écosystème comme les sédiments ou les digesteurs anaérobies.

3.2.3. Compétition avec les bactéries sulfato-réductrices

Dans le lisier de porcs, le sulfate apporté par l'alimentation conduit à une concentration en ion sulfate très importante qui peut varier au cours du stockage entre **1660 et 6030 mg/L** (Wu *et al.*, 1999). La présence de ce sulfate va permettre le développement de **bactéries sulfato-réductrices** (BSR) qui l'utilisent comme accepteur d'électrons et le réduisent en sulfure d'hydrogène conformément à la réaction suivante :

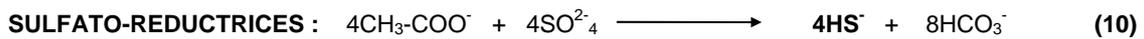


SULFATE

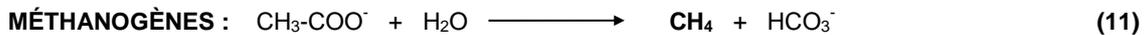
SULFURE
D'HYDROGENE

$$\Delta G^{\circ} = -153 \text{ kJ/mol}$$

Les bactéries méthanogènes et sulfato-réductrices utilisant des sources de carbone communes (mélange H₂/CO₂, mais aussi acétate), une compétition pour ces substrats va s'établir entre ces deux groupes bactériens. Cette compétition est en général en faveur des bactéries sulfato-réductrices étant donné que les réactions d'utilisation de ces substrats sont en général thermodynamiquement plus favorables en présence de sulfate et que l'affinité des BSR pour ces substrats est aussi généralement plus forte (**Fig. 3.7**) (Oremland, 1988 ; Vogels *et al.*, 1988).



$$\Delta G^\circ = -72 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^\circ = -31 \text{ kJ/mol}$$

Figure 3.7. Compétition pour l'acétate entre les bactéries sulfato-réductrices et les *Archaea* méthanogènes acétotrophes.

Deux groupes de bactéries sulfato-réductrices existent :

- Le **groupe I** croît en présence de lactate et de sulfate, mais ne peut pas utiliser l'acétate, le propionate ou le butyrate comme unique donneur d'électron et source de carbone. Ce groupe ne fait qu'une oxydation incomplète des substrats en acétate. A l'intérieur de ce groupe on retrouve les genres *Desulfomonas* et *Desulfovibrio*⁶.
- Le **groupe II** peut utiliser des AGV, le benzoate, l'acide formique, l'H₂ (ce dernier en chimio-autotrophie) comme donneurs d'électrons et le CO₂ comme source unique de carbone. Ce groupe est capable de réaliser une oxydation complète des substrats jusqu'au CO₂. Les genres les plus représentatifs sont *Desulfobacter*, *Desulfococcus* et *Desulfosarcina* (Zehnder et Stumm, 1988).

⁶ Les *Desulfovibrio* sont en général capables d'utiliser l'hydrogène comme donneur d'électrons.

3.3. Changements du tube digestif au lisier

Le tube digestif et le lisier représentent deux écosystèmes anaérobies différents. Le passage des fèces de l'animal au lisier implique des changements importants d'environnement pour la communauté microbienne.

3.3.1. Le changement des conditions physiques et chimiques

Parmi les changements de conditions physiques, l'abaissement de la température est le paramètre le plus variable puisqu'il va changer d'un élevage à un autre selon la structure de l'exploitation et en fonction des saisons. Le potentiel redox et le pH, en revanche, semblent relativement stables d'un lisier à un autre et se situent dans des valeurs qui permettent la méthanogénèse : environ -350 mV^7 de potentiel redox et entre 6,9 et 7,7 de valeur de pH (Zehnder et Stumm, 1988 ; Sorlini et Bonfanti, 1989).

Les changements les plus importants concernent les conditions chimiques de l'environnement :

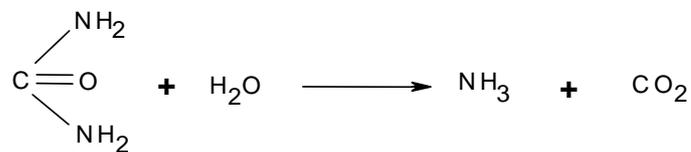
- Les AGV produits par la dégradation anaérobie de la matière organique ne sont plus absorbés par l'intestin du porc et la communauté microbienne acétotrophe qui provient de l'intestin est peu nombreuse. Les AGV vont s'accumuler assez rapidement au cours du stockage du lisier. Leur concentration est variable de 4 à 28 g/L mais leur répartition est presque toujours identique : 60 % des AGV totaux sont sous forme d'acide acétique, 25 % sous forme d'acide propionique, 10 % sous forme d'acide butyrique et 5 % sous d'autres formes (acide isobutyrique, isovalérique et valérique) (Spoelstra, 1979). La majeure partie des AGV produits a pour origine exclusive les matières fécales. Les protéines et les fibres végétales non digérées par les porcs sont les principaux substrats (Cooper et Cornforth, 1978 ; Spoelstra, 1979 ; Mackie *et al.*, 1998). Comme nous l'avons vu précédemment, cette accumulation des AGVs peut avoir un effet néfaste sur la chaîne de digestion anaérobie.
- Le mélange de l'urine et des fèces augmente fortement la concentration en ammoniac du milieu. Cet ammoniac a deux origines : *i)* L'animal utilise moins de 30 % de l'azote contenu dans son alimentation. Le reste est excrété dans l'urine pour 50 à

⁷ Mesuré par rapport au électrode de référence : AgCl/Ag.

80 % et les fèces (20 à 50 %). **L'urée** rejetée par les urines est rapidement hydrolysée en ammonium (NH_4^+) et en ions bicarbonate par les uréases microbiens présentes en grande quantité dans les fèces (**Fig. 3.8a**). Cette hydrolyse s'effectue très rapidement, en quelques heures (Béline *et al.*, 1998b). *ii*) **Les protéines non digérées** par l'animal contiennent environ 50 % de l'azote fécal. Leur dégradation pendant le stockage du lisier va libérer une quantité non négligeable d'ammonium (**Fig. 3.8b**).

Les quantités d'ammonium retrouvées dans le lisier se situent entre 2 et 5 g/L et représentent 75 % de l'azote total (Hobbs *et al.*, 1997 ; Béline, 2001b). Il est important de souligner le rôle important du pH sur l'équilibre du couple acido-basique ammoniac - ammonium. A un pH élevé (>9), la forme prédominante est l'ammoniac (NH_3) qui peut être transféré vers l'atmosphère par un phénomène de volatilisation ; mais qui peut aussi être la cause de phénomène d'inhibition pour certaines populations de bactéries et surtout d'*Archaea* (Koster et Lettinga, 1984 ; Koster, 1986b ; Koster et Lettinga, 1988a ; Koster et Koomen, 1988b ; Hartung et Phillips, 1994).

(a) Réaction d'hydrolyse de l'urée



(b) Réaction de désamination :

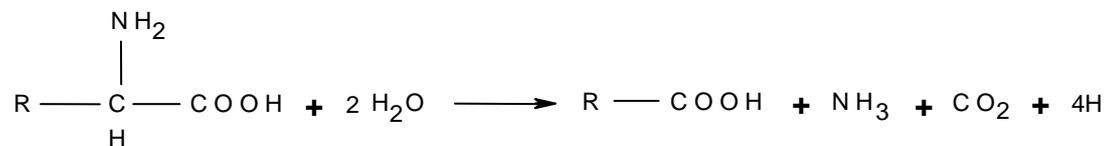


Figure 3.8. Voies d'obtention d'azote ammoniacal (a) à partir de l'hydrolyse de l'urée et (b) du catabolisme des acides aminés. Les différents composés ne sont pas présentés dans leur forme majoritaire à pH=7.

Le changement d'espace physique conduit à l'accumulation de composés connus pour déséquilibrer la chaîne trophique de la digestion anaérobie dans les réacteurs biologiques comme les AGV et l'hydrogène (Sorlini et Bonfanti, 1989).

3.3.2. La flore microbienne

Plusieurs travaux ont été effectués pour décrire la flore microbienne du lisier de porcs en utilisant des **techniques classiques** de dénombrement bactérien par colorations (Gram ; DAPI) et des méthodes avec des milieux de culture, ainsi que des **techniques moléculaires**.

Les travaux de dénombrement bactérien réalisés sur milieu de culture varient d'un facteur 100 selon les études effectuées et se situent entre 1×10^7 et 2×10^9 bactéries/mL (**Tableau 3.4**).

Tableau 3.4. Dénombrement de la flore bactérienne du lisier de porcs.

Ecosystème	Dénombrements (UFC/mL)		Références
	Anaérobie	Aérobie	
Réacteur de traitement anaérobie de lisier	6×10^8	3×10^8	(Hobson et Shaw, 1974)
Stockage anaérobie de lisier	5×10^7	1×10^7	(Rivière <i>et al.</i> , 1974)
Stockage anaérobie de lisier	4×10^8	25×10^8	(Spoelstra, 1978)
Stockage anaérobie de lisier	2×10^9	n.t.	(Cotta <i>et al.</i> , 2003)

n.t. = n'a pas été testé.

Ce nombre diminue avec le temps au cours du stockage. Après 11 semaines de stockage, les microflore aérobie et anaérobie ne représentent plus que 1,2 % et 0,8 % du nombre initialement présent, respectivement (Rivière *et al.*, 1974). Un autre travail (Bisaillon *et al.*, 1984), fait le même constat, les groupes microbiens aérobies et anaérobies sont fortement affectés par le temps d'entreposage. Cette forte diminution doit être nuancée car certains micro-organismes peuvent avoir développé des formes de résistance (spores) ou être passés dans un état viable mais non cultivable. Une comparaison récente entre le comptage direct au microscope (10×10^9 bactéries/mL) et l'isolement sur différents milieux de culture a montré qu'en moyenne seulement 20 % des micro-organismes observés dans le lisier sont cultivables (Spoelstra, 1978).

En utilisant les **méthodes classiques d'isolement** et d'identification suivant les caractères phénotypiques, plusieurs auteurs ont décrit les flores présentes dans le lisier de porc (**Tableau 3.5**). (Hobson et Shaw, 1974) a analysé trois échantillons de

différents lisiers présentant des temps de stockage plus ou moins long (plusieurs mois). Dans le premier il a identifié comme groupes dominants *Streptococcus* (69 % des colonies), *Clostridium* (20 %) et *Bacteroides* (5 %). Pour le second la répartition était de *Bacteroides* (40 %), *Streptococcus* (39 %) et *Staphylococcus* (4 %). Dans son dernier échantillon, 70 % des bactéries identifiées appartiennent au genre *Streptococcus* et 20 % appartiennent au genre *Bacteroides* ; seulement un isolat appartient au genre *Clostridium*.

Tableau 3.5. Diversité microbienne dans le lisier de porcs.

Nom systématique ou phylogénétique	Observation	Référence
Diversité des BACTERIA dans le lisier :		
<i>Peptostreptococcus</i> sp., <i>Eubacterium</i> sp., <i>Bacteroides</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. et <i>Peptococcus</i> sp.	Les bactéries ont été isolées d'un digesteur qui traitait du lisier.	(Iannotti <i>et al.</i> , 1982)
<i>Salmonella</i> spp. et <i>Campylobacter</i> spp.	L'étude n'a analysé que des pathogènes	(Watabe <i>et al.</i> , 2003)
<i>Clostridium butyricum</i> , <i>C. disporicum</i> , <i>Pedobacter</i> sp. et <i>Rhodanobacter</i> sp.	Cette étude a suggéré que la population de <i>Clostridium</i> est très stable.	(Lung et Topp, 2001) ^b
Groupe <i>Clostridium coccooides</i> (2.30.4.1) ^a , <i>C. botulinum</i> group (2.30.9.2), <i>Enterococcus</i> group (2.30.7.20), <i>Abiotrophia</i> group (2.30.7.16) et <i>Bacteroides</i> group (2.15.1.2).	Les espèces ont été cultivées et ensuite analysées.	(Whitehead et Cotta, 1999 ; Whitehead et Cotta, 2001 ; Cotta <i>et al.</i> , 2003) ^b
Diversité des ARCHAEA dans le lisier :		
<i>Methanobacteriales</i> (1.1.2), <i>Methanomicrobiales</i> (1.1.3.1) et <i>Thermoplasmatales</i> et apparentées (1.1.3.5)	Aucune séquence liée aux acétotrophes n'a été détectée.	(Whitehead et Cotta, 1999 ; Cotta <i>et al.</i> , 2003) ^b
Diversité des EUCARYA dans le lisier :		
Aucune étude réalisée.		

a. Numéro du groupe défini par le Ribosomal Database Project II.

b. Etude réalisée avec des outils moléculaires.

Une autre étude réalisée par (Spoelstra, 1978) identifie 40 isolats comme *Peptostreptococcus* et *Peptococcus* (57 % des colonies) fermentant ou non les hydrates de carbone, *Ruminococcus* (12 %), *Bacteroides* (21 %) et non identifiés (8

%). D'autre part, un travail sur la caractérisation de 130 souches bactériennes isolées d'un digesteur anaérobie de lisier a montré une diversité répartie ainsi : 30 % de *Bacteroides*, 22 % d'*Eubacterium* 18 % de *Peptostreptococcus*, 8 % de *Lactobacillus*, 3 % de *Clostridium*, 2 % de *Peptococcus*, 1 % de *Streptococcus* et 15 % des souches n'ont pu être identifiées (Iannotti *et al.*, 1982). Concernant les **Archaea et Eucarya**, aucun travail n'a été fait par les **méthodes classiques** sur le lisier de porcs.

Une seule **étude moléculaire**, très limitée par le nombre de séquences analysées (54 séquences d'ADNr), s'est consacrée à la communauté microbienne du **lisier de porcs** (Whitehead et Cotta, 1999 ; Whitehead et Cotta, 2001). Dans cette étude, seulement 56 % des séquences bactériennes obtenues se sont révélées proches de séquences connues (similarité supérieure à 95 %) et 98 % d'entre elles **appartiennent aux bactéries Gram positives à bas GC %**. Le genre le plus représenté est *Clostridium* (61 % des séquences), les autres séquences (similarité inférieure à 95 %) appartiennent aux genres *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* et *Desulfovibrio*. L'analyse des *Archaea* a mis en évidence la présence de trois groupes phylogénétiques : ***Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*** et un groupe de séquences phylogénétiquement éloignées des *Archaea* cultivées. La fonction des micro-organismes⁸ de ce dernier groupe reste inconnue (Tajima *et al.*, 2001), le groupe cultivé le plus proche est celui des ***Thermoplasmatales* et apparentés**.

En résumé, la distribution des groupes bactériens isolés des lisiers de porcs adultes présente une forte variabilité selon les outils utilisés dans les études. Cependant quelques grandes lignes apparaissent clairement : *i*) près de 80 % des bactéries présentes sont des bactéries Gram positives à bas GC %, *ii*) la plupart d'entre elles sont anaérobies strictes ou facultatives (fermentaires), *iii*) une forte proportion d'entre elles sont des coques, et *iv*) les genres bactériens les plus retrouvés dans le lisier sont : *Streptococcus*, *Peptococcus* et *Peptostreptococcus* pour les coques Gram positifs, des coccobacilles et lactobacilles Gram positifs (*Eubacterium* et *Lactobacillus*), des bâtonnets Gram positifs et négatifs (*Clostridium* et *Bacteroides*, respectivement). Cette diversité bactérienne est quasi identique, à part une plus faible proportion de *Lactobacillus* à celle de la flore intestinale de porc décrite auparavant. Les *Archaea* retrouvées sont des méthanogènes hydrogénotrophes ou de fonction inconnue. Aucune étude n'a été faite pour analyser la diversité eucaryote.

⁸ Représentés par leurs séquences d'ADNr 16S.

3.4. Changements du tube digestif au fumier

Le fumier de porcs est un écosystème très différent de ceux du lisier et du tube digestif porcin. Sa structure favorise le maintien de **conditions aérobies** en surface et la dégradation de la matière organique par **une communauté microbienne aérobie ou anaérobie facultative** (Mustin, 1987). Si la décomposition se déroule dans un milieu bien aéré, la plus grande partie du carbone est libérée sous forme de CO₂. Cependant, dans un milieu pauvre en oxygène, il peut y avoir production de grandes quantités de méthane grâce à la persistance de populations anaérobies.

3.4.1. Le changement des conditions physiques et chimiques

Les fumiers de porcs étant très hétérogènes, ils sont difficiles à caractériser simplement parce qu'ils sont composés de parties pailleuses ou de sciure très aérées, de parties déjà décomposées, et d'autres très peu perméables. Ils ont une structure et une composition très variable qui présente des comportements différents suivant l'âge du fumier, le type d'élevage ou le type de conduite de l'exploitation. Les caractéristiques physiques du fumier dépendent de la quantité du support mais aussi de l'activité microbienne qui y règne. En effet celle-ci influe sur des paramètres comme la consommation d'oxygène, la température et la teneur en eau du fumier (Mustin, 1987 ; Tiquia *et al.*, 1996).

Le fumier est un environnement avec un pH élevé (environ 8) dû à l'ammoniac contenu qui peut atteindre une concentration entre 5,75 et 8,43 mg N-NH₄⁺/g. Généralement, il présente une faible concentration en urée, nitrite et nitrate et une concentration élevée en protéines et sulfate non dissous. Au cours de la dégradation de la matière organique, le processus de minéralisation entraîne une diminution de l'azote organique (3 à 42 %), au profit d'azote minéral (1 à 22 %). Selon les études, les pertes en azote sont très variables. Pour certains, l'azote ammoniacal ne se volatilise pas mais reste en solution. On ne le retrouve qu'à l'état de trace dans le biogaz. Selon une autre estimation, la proportion d'azote contenue dans le fumier de porcs et perdue sous forme de NH₃ est inférieure à 10 % dans les systèmes d'entreposage anaérobies, de 10 à 25 % dans les systèmes semi-aérobies et de 25 à 85 % pendant le compostage (Eklind et Kirchmann, 2000 ; Agriculture et Agroalimentaire, 2003).

Normalement, dans les conditions aérées du fumier, la concentration en nitrate augmente pendant que celle de l'ammoniac diminue due à l'activité nitrifiante des micro-organismes. La production de composés malodorants, comme les AGV, s'arrête et les problèmes liés à ces composés diminuent par rapport au lisier. Le rapport C/N diminue pendant la minéralisation de la matière organique, alors que la majeure partie de l'azote total est conservée (Chan *et al.*, 1994 ; Tiquia *et al.*, 1997 ; Tiquia *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 2004).

3.4.2. La flore microbienne

Aucune étude sur la diversité de la flore microbienne du fumier de porcs frais n'a été réalisée, mais plusieurs travaux sur la flore microbienne aérobie au cours du compostage du fumier ont été effectués à l'aide des outils classiques de microbiologie.

Les **dénombrements** bactériens du fumier de porcs varient d'une étude à une autre et selon le temps de compostage (**Tableau 3.6**). Plusieurs études se sont limitées aux bactéries hétérotrophes mésophiles et thermophiles ainsi qu'aux indicateurs fécaux.

Les groupes bactériens mésophiles trouvés dans le compost incluent les Azotobactériaceae, les *Pseudomonadales*, les Lactobacillaceae, les Rhizobactériaceae, les Achromobactériaceae, les Enterobactériaceae et les Corynébactériaceae. D'autre part, les groupes thermophiles dominants sont *Bacillus* spp., les *Actinomycetes* ou Actinobactéries (*Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* et *Micromonospora*) et *Thermus* spp. (Mustin, 1987 ; Tuomela *et al.*, 2000).

Un travail réalisé sur le fumier de porcs à base de sciure a montré l'existence probable d'une flore bactérienne nitrifiante en début de compostage (Huang *et al.*, 2004). De même, la présence d'un nombre important de bactéries ammonifiantes, nitrifiantes et dénitrifiantes a été suggéré lors du compostage de fumier de volaille et de fumier bovin (Tiquia et Tam, 2002 ; Tang *et al.*, 2003).

Tableau 3.6. Diversité microbienne dans le fumier de porcs.

Nom systématique	Observation	Dénombrements aérobie UFC/g	Référence
Diversité des <i>BACTERIA</i> dans le fumier au début du compostage :			
Bactéries hétérotrophes.	Isolements sélectifs pour suivre la maturation du compost.	10^9 à 10^{10}	(Tiquia <i>et al.</i> , 1996)
Bactéries hétérotrophes.	Isolements sélectifs pour suivre la maturation du compost.	10^7 à 10^8	(Tiquia <i>et al.</i> , 1997)
Bactéries hétérotrophes mésophiles (<i>Actinomycetes</i>)	Mélange de fumier de bétail et de truies (10 : 1).	10^{10}	(Vuorinen et Saharinen, 1997)
Bactéries hétérotrophes thermophiles		10^9	
Coliformes fécaux		10^7	
Streptocoques		10^7	
<i>Actinomycetes</i>	Compostage réalisé avec une très forte aération.	10^9	(Tiquia et Tam, 1998)
Coliformes fécaux		10^5	
Streptocoques		10^5	
<i>Salmonella</i> sp..		présente	
Bactéries hétérotrophes mésophiles	Isolements sélectifs pour suivre la maturation du compost.	10^8	(Tiquia <i>et al.</i> , 1998)
Bactéries hétérotrophes thermophiles.		10^7	
Evidence de la présence d'une flore bactérienne nitrifiante.	Déduction faite par analyse des paramètres physico-chimiques liés à l'azote.	n.t.	(Huang <i>et al.</i> , 2004)
Diversité des <i>ARCHAEA</i> dans le fumier au début du compostage :			
Aucune étude réalisée.			
Diversité des <i>EUCARYA</i> dans le fumier au début du compostage :			
Aucune étude réalisée.			

Aucune étude n'a été réalisée concernant la communauté *Archaea* du fumier, mais leur développement est probablement limité à cause de la présence d'oxygène. Par contre, les eucaryotes deviennent dominants, surtout les champignons filamenteux qui sont capables de dégrader la lignine et la cellulose comme le genre *Phanerochaete* (Mustin, 1987 ; Tuomela *et al.*, 2000).

UN DERNIER COMMENTAIRE

L'étude bibliographique a indiqué que l'augmentation du nombre de porcheries et de leurs capacités est à l'origine de résultats néfastes pour l'homme et son environnement. Cet élevage massif génère de grandes quantités de lisier dont l'épandage, sans traitement préalable, conduit à des problèmes d'odeur, de pollution des nappes phréatiques, de production d'ammoniac et de dissémination de germes indésirables. Pour faire face à ces problèmes, des alternatives existent. Parmi elles, les élevages sur litière producteurs de fumiers sont d'aspect plus traditionnel et bénéficient d'une bonne image vis à vis du public. Ils présentent l'avantage de ne pas produire de lisier malodorant et sont donc moins polluants que les élevages sur caillebotis.

Bien que les transformations microbiennes soient au cœur des problèmes rencontrés dans la gestion des déjections animales, les connaissances actuelles sur la structure et l'évolution de la communauté microbienne du lisier sont peu développées et essentiellement basées sur des méthodes de culture. Celles sur la microbiologie du fumier sont quasiment inexistantes. Pourtant les outils de biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'identifier et de suivre les micro-organismes sans culture ni connaissances préalables. La caractérisation microbiologique des lisiers et fumiers pourrait aider à la compréhension des phénomènes à la base des nuisances générées par le lisier et les déjections animales en général.

Le projet français "**Porcherie Verte**" envisage des actions concrètes pour proposer des solutions à la gestion des effluents porcins. L'action que nous avons entreprise avait comme objectif «**La caractérisation de la flore microbienne des déchets d'élevage de porc**» et a fait l'objet de ce travail de thèse. Les deux premiers chapitres de résultat présenteront donc l'analyse des communautés microbiennes du lisier et du fumier porcin à l'aide des outils moléculaires de clonage et de séquençage des ADNr 16S. Cette analyse, combinée avec les mesures des paramètres physico-chimiques des écosystèmes, nous permettront, par comparaison avec les données bibliographiques, de placer les groupes microbiens observés dans la chaîne trophique de la digestion anaérobie pour le lisier ou le métabolisme de l'azote pour le fumier. Dans le dernier chapitre de résultat, un phylotype très abondant dans l'intestin, le lisier et le fumier de porc sera proposé comme indicateur de contamination et utilisé pour le développement d'un système de détection par PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) en

temps réel ou quantitative. Sa persistance sur l'ensemble de la filière d'élevage sera évaluée depuis les fèces des animaux jusqu'à l'épandage du lisier sur le sol. Enfin, les points importants des résultats obtenus seront discutés et mis en perspective des travaux futurs à réaliser.

MATERIELS et METHODES : CHAPITRE 4

CHAPITRE 4

Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail seront présentés. Dans un premier temps, les porcheries ainsi que le matériel biologique utilisé seront décrits dans le détail. Ensuite, seront exposées les différentes méthodes d'analyse utilisées pour la caractérisation physico-chimique des écosystèmes étudiés. Enfin, les techniques de biologie moléculaire permettant la caractérisation de la structure des communautés microbiennes ainsi que le suivi des indicateurs de contamination fécale par PCR quantitative seront décrites.

4.1. Description des porcheries

Les prélèvements ont été effectués dans plusieurs porcheries situées dans le Lauragais ou en Bretagne.

4.1.1. Description de la porcherie utilisée pour l'inventaire moléculaire de la communauté microbienne du lisier de porcs.

L'élevage de «La Pomarède» du Groupe Coopératif Occitan (anciennement Coopérative Agricole Lauragaise) est un élevage de sélection de 300 truies produisant 5600 porcelets par an, dont 2600 femelles reproductrices commercialisées à 110 Kg. Les effectifs porcins (races croisées Large white et Landrace) représentent 1100 truies et une production annuelle que l'on peut estimer à 20 000 porcelets vendus à 25 Kg et 2 600 porcs élevés de 7 à 110 Kg (Coillard et Texier, 1994). Ces effectifs sont répartis dans quatre bâtiments selon le poids des porcs et leurs régimes alimentaires.

La composition de la nourriture est présentée dans le **Tableau 4.1**. Cette nourriture standard comprend des métaux lourds à une concentration variable selon l'âge des animaux.

Tableau 4.1. Composition de la nourriture standard des porcs

Nourriture	(%)	Facteur de croissance	Antibactérien
Céréales (blé, maïs)	55 %	Cuivre	Zinc
Pois fourragé ^r	10 %		
Issus de blé (son remoulage)	20 %		
Tourteau (colza ou soja)	10 %		
Minéraux (PO ₄)	5 %		

Le volume annuel de lisier produit est d'environ 14 600 m³, soit 40 m³ par jour. Cette quantité journalière représente 1 600 Kg de matières sèches, 1 500 Kg de DCO et 540 Kg de DBO₅ rejetées, mais aussi 160 Kg d'azote dont 75 % d'ammoniac. Pour ces volumes, la porcherie dispose d'une station d'épuration (Coillard et Texier, 1994).

L'inventaire de la communauté microbienne a été effectué sur le lisier brut de la préfosse du bâtiment d'engraissement. Cette préfosse avait reçu les déjections de 60 porcs pendant 3 semaines.

4.1.2. Description des porcheries utilisées pour l'inventaire moléculaire de la communauté microbienne du fumier de porcs.

Quatre porcheries ont été choisies pour la réalisation des inventaires moléculaires de fumier de porcs à base de paille et de sciure.

Deux fumiers sur paille ont été obtenus :

- de la station de Romillé (35) de l'institut Technique du Porc (ITP). Cet élevage avait des porcs de la race croisée Large white/ Landrace et Large white/Piétrain qui ont été nourris avec une alimentation standard.
- d'une exploitation de la région de Montbazens (12). Cette exploitation élève des porcs charcutiers issus d'un croisement de truies Neima avec des verrats Pig416. Les animaux sont nourris à volonté avec une alimentation standard.

Les deux fumiers sur sciure ont été prélevés :

- à la station expérimentale de Guernevez (35). La race des porcs ne nous a pas été communiquée. La nourriture des animaux était de type biphase.
- au centre INRA de Saint Gilles (35). Les porcs issus d'un croisement lignée synthétique et Large white/ Landrace ont été nourris à volonté avec une alimentation standard.

Les principales caractéristiques de ces élevages sont résumées dans le **Tableau 4.2**.

Tableau 4.2. Caractéristiques des élevages producteurs de fumiers prélevés pour cette étude.

Caractéristiques :	Station de Romillé /	Station expérimentale de Guernevez /
	Exploitation de Montbazens	INRA de Saint Gilles
Type de litière	Litière accumulée	Litière accumulée
Nombre de porcs dans le bâtiment	150 porcelets / 320 porcs	96 porcs / 20 porcs
Volume de support par porc	12 / 77 Kg	48 Kg / inconnu
Type de fumier produit	Fumier sur paille	Fumier sur sciure
Volume du fumier produit	34 kg / inconnu	Inconnu / 200 KG
Age du fumier (jours)	32 / 119	111 / 155
Banques ADNr 16S produites (<i>Bacteria</i>)	PILAD ^a , PILAE / PILAF, PILAG	PILAI, PILAJ / PILAL, PILAM, PILAN
Banques ADNr 16S produites (<i>Archaea</i>)	PILDH / PILDG	PILDJ, PILDK / PILDN, PILDN

a. PIL = Pig litter.

4.1.3. Description de la porcherie utilisée pour le suivi des indicateurs de contamination fécale du porc par PCR en temps réel.

L'exploitation agricole choisie est un élevage de type naisseur–engraisseur de 220 truies Large-White. Elle produit 4 500 porcs et génère environ 4 500 m³ de lisier par an. Les porcs sont élevés dans des bâtiments sur des caillebotis intégraux. Les fèces et les urines s'écoulent dans des préfosse situées en-dessous de l'animal. Le lisier chemine par gravité vers une fosse de stockage couverte et homogénéisée d'une capacité de 800 m³. Un système de *Flushage* permet une re-circulation du lisier entre la fosse de stockage et le bâtiment tous les 15 jours environ. Chaque semaine une

partie du lisier stocké est tamisée à l'aide d'une vis compacteuse. La fraction solide est stockée dans un bâtiment en attente d'épandage. La fraction liquide est stockée dans une lagune à ciel ouvert en attendant d'être épandue sur les terres agricoles.

Sur cet élevage, le lisier est utilisé à deux niveaux par les agriculteurs (**Figure 4.1**). Le premier fait l'épandage du lisier brut présent dans la fosse de stockage tandis que le second utilise le lisier de la lagune de la même filière.

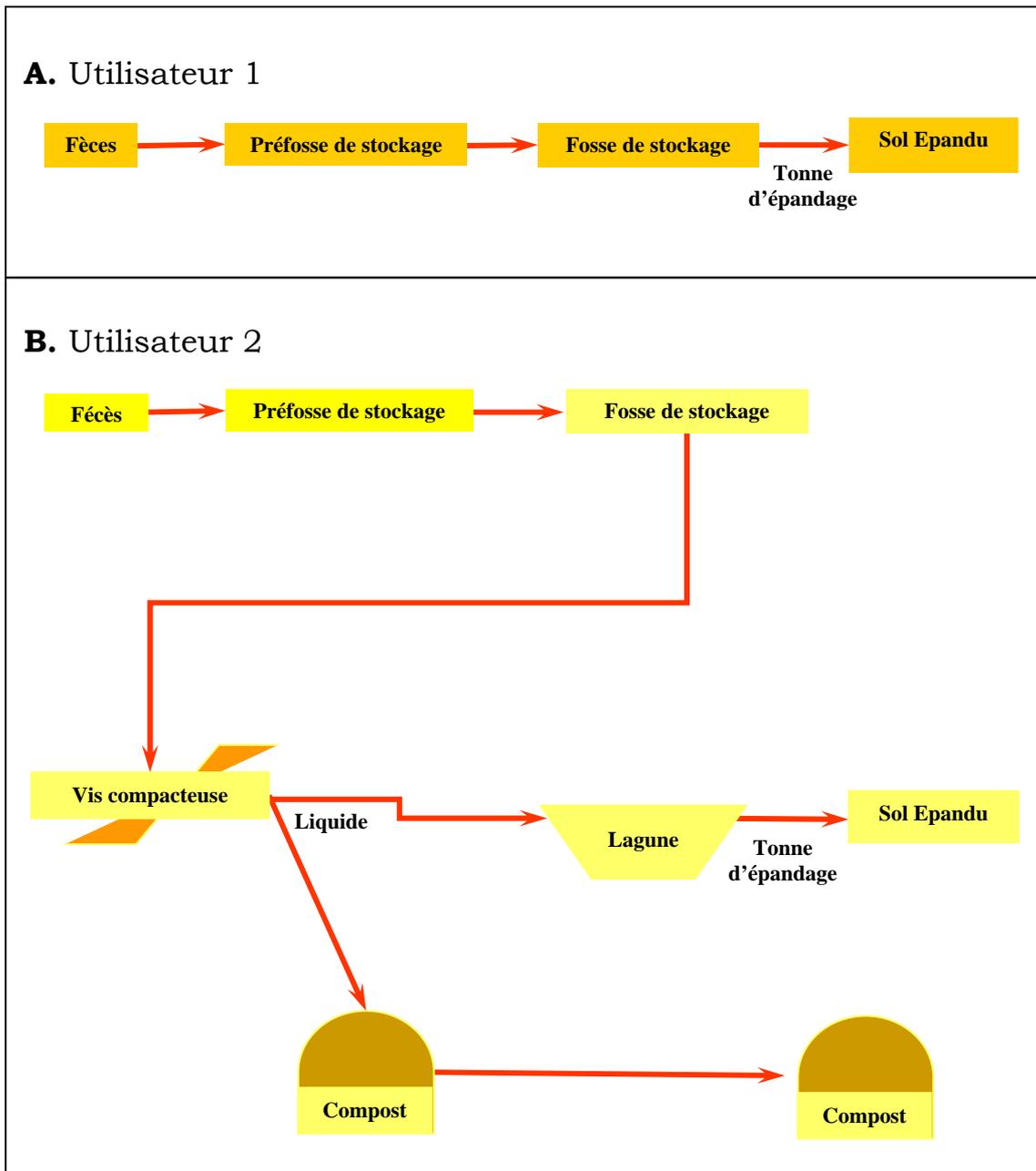


Figure 4.1. Schéma de la filière choisie pour le suivi des indicateurs de contamination fécale dans un système d'élevage sur caillebotis.

4.2. Description des techniques de biologie moléculaire

Le schéma de la méthodologie utilisée pour l'étude de la diversité microbienne du lisier de porcs est présenté dans la **Fig. 4.2**. Les techniques mises en œuvre sont toutes basées sur la détection et l'analyse des gènes codants pour les ARN ribosomiaux 16S microbiens.

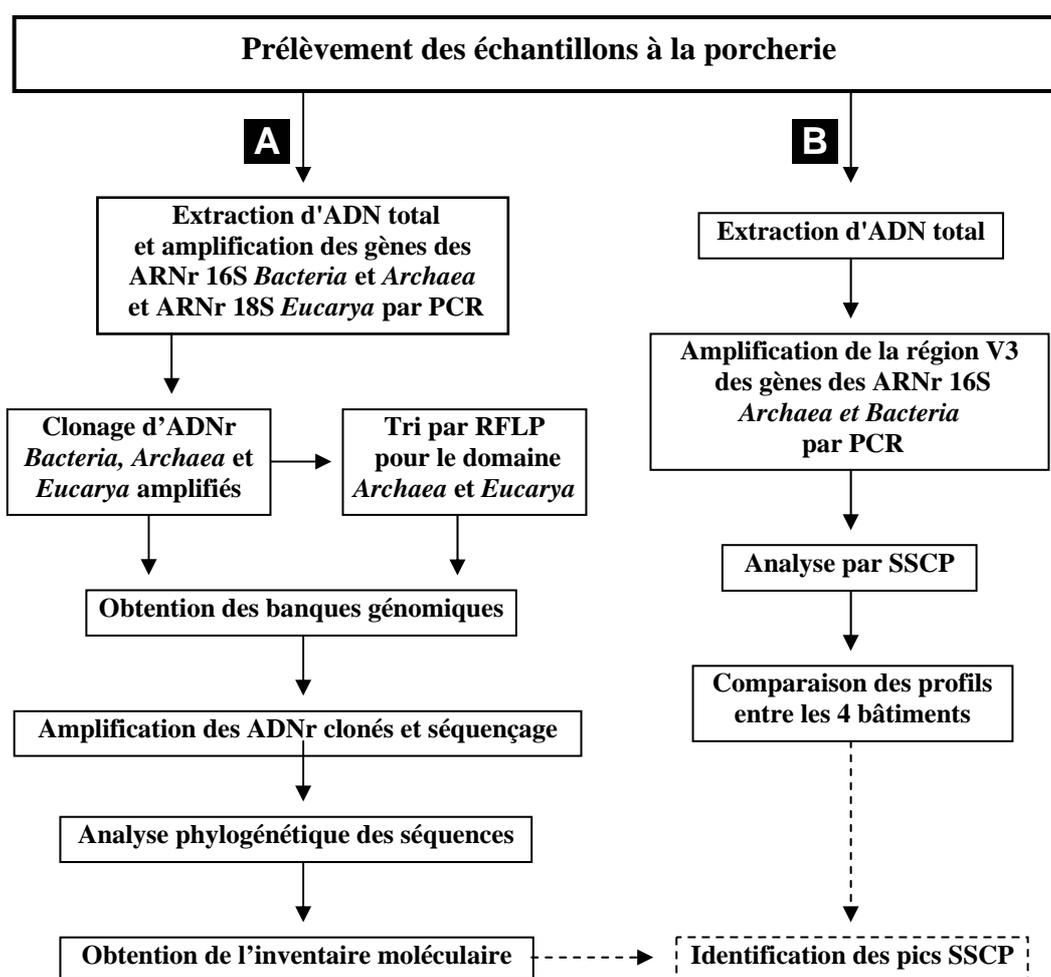


Figure 4.2. Schéma de la méthodologie utilisée pour l'étude de la diversité microbienne des lisiers de porcs à partir d'un inventaire moléculaire (A) et de la structure globale de la communauté microbienne (B).

La caractérisation de **la diversité des communautés microbiennes** est effectuée par inventaire moléculaire des ADNr 16S/18S microbiens. Sur les lisiers et les fumiers, l'ADN total de l'échantillon est extrait par un système de lyse cellulaire mécanique

(Godon *et al.*, 1997) et purification de l'ADN sur colonne. Les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S/18S microbiens sont amplifiés sélectivement par PCR avec des amorces ciblant les domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*, puis clonés chez *Escherichia coli* et séquencés partiellement. Les micro-organismes présents dans l'échantillon sont ainsi identifiés par comparaison des séquences obtenues avec les séquences présentes dans les banques de données et par analyse phylogénétique (**Fig. 4.2**). Cette technique permet d'identifier un grand nombre d'espèces présentes dans l'échantillon sans avoir à les isoler.

D'autre part, une vision globale des communautés microbiennes a été obtenue par amplification PCR de la région V3 des gènes des ARNr 16S et électrophorèse SSCP (**Single Strand Conformation Polymorphism**). Cette technique permet d'obtenir un électrophorégramme présentant une image rapide de la diversité des espèces microbiennes dans l'écosystème et de leur abondance relative (**Fig. 4.2 et 4.4**).

4.2.1. Le prélèvement et la conservation des échantillons

Les lisiers et fumiers étant des milieux relativement hétérogènes, des mesures particulières ont été prises pour réduire au maximum les biais pouvant survenir aux étapes de prélèvement :

- 1) Utilisation d'un dispositif pour le prélèvement en conditions anaérobies du lisier (**Fig. 4.3**).
- 2) Homogénéisation des échantillons à chaque étape avant l'extraction de l'ADN total.
- 3) Réalisation de plusieurs clonages pour le domaine *Bacteria* et leur comparaison.

Pour **les lisiers**, trois prélèvements de 300 mL chacun ont été effectués en surface, puis en profondeur, et mélangés pour obtenir un prélèvement moyen (**Fig. 4.4**). Ils ont été conservés à température ambiante et traités le jour même au laboratoire. Pour les lisiers bruts et les fractions liquides de lisier, 10 mL de liquide homogénéisé ont été centrifugés à 7000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, le culot a été repris dans 4 mL de guanidine thiocyanate¹ 4M Tris-HCl (pH=7,5) et 600 µL de N-Lauroyl-sarcosine au 10 % afin d'inactiver les activités enzymatiques. Après homogénéisation au mortier (maintenu dans la glace), quatre aliquotes de 500 µL ont été stockés à -20 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Pour les fractions solides après compaction, 10 g ont été prélevés et broyés au mortier dans la glace en présence de 8 mL de guanidine

¹ Elle inhibe l'action des DNAses susceptibles de dégrader l'ADN.

thiocyanate 4 M Tris-Cl 0.1 M pH 7,5 et de 1,6 mL de N-lauryl sarcosine 10 %. Après homogénéisation, les mélanges ont été aliquotés par 500 μ L et congelés à -20°C .

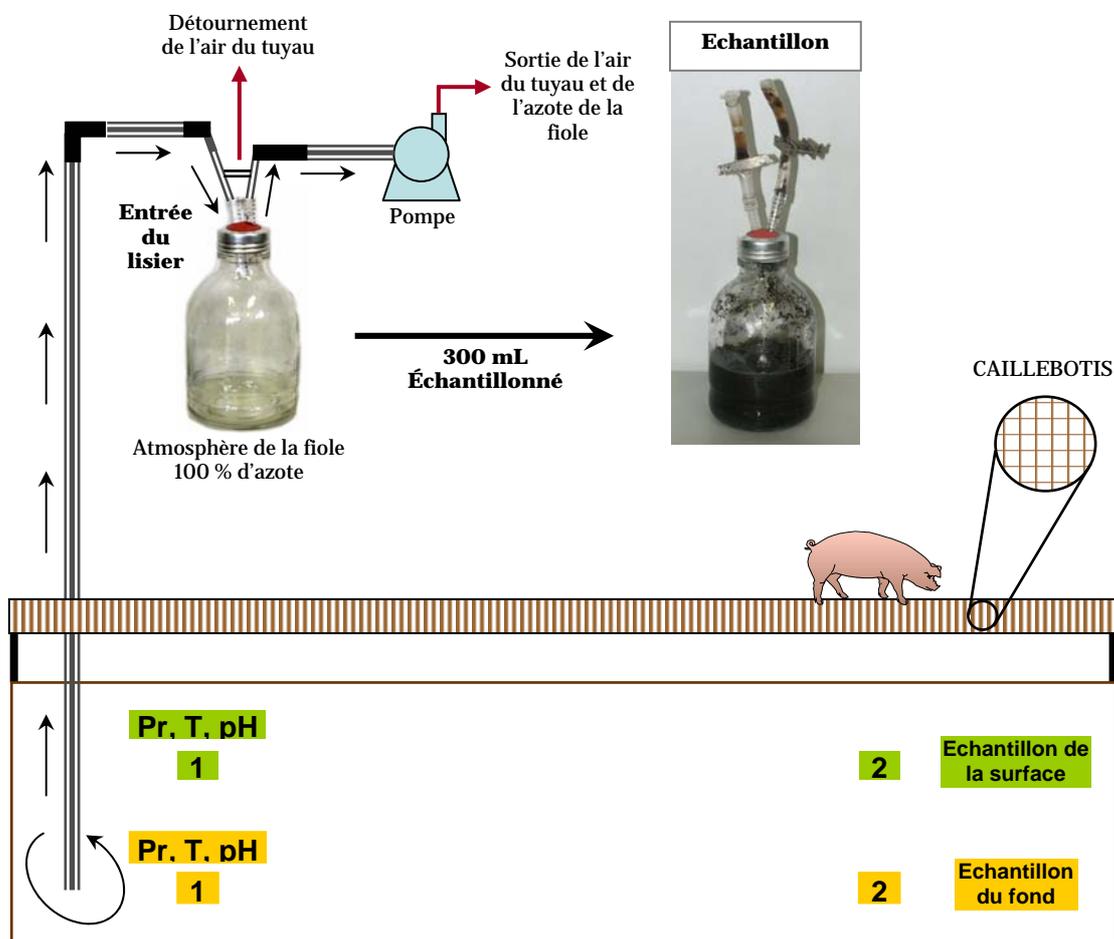


Figure 4.3. Prélèvement dans la préfosse du bâtiment des porcs à l'engraisement de type caillebotis. La préfosse recevait les déjections de 60 porcs. Le volume de lisier dans la préfosse était de 5.4 m^3 et il y avait 30 cm de profondeur. L'échantillon a été prélevé à la fin du stockage (3 semaines). Les chiffres indiquent la localisation de chaque point de prélèvement et de mesure *in situ* (Pr = Potentiel redox et T = température) pour l'échantillon du fond et de la surface. La flèche circulaire montre le mouvement du tuyau pendant l'échantillonnage.

Pour les **échantillons de fèces et de sols (Image 4.1)**, un poids de 2 g et de 10 g respectivement ont été homogénéisés dans un mortier avec 4 mL de guanidine thiocyanate 4M Tris-HCl (pH=7,5) et 600 μ L de N-Lauroyl-sarcosine au 10 %. Les échantillons de sols ont été tamisés avant traitement avec un tamis carré de 5 mm de maille. Quatre aliquotes de 500 μ L ont été stockés à -20°C . Pour certains échantillons

de sol, particulièrement secs, la quantité de réactifs a dû être augmentée jusqu'à cinq fois son volume habituel pour permettre un prélèvement homogène de 500 μ L.

Enfin, pour **le fumier**, quatre prélèvements de litière, deux sur paille et deux sur sciure (**Image 4.1**), chacun pesant de 3 à 4 kg environ, ont été récoltés dans quatre élevages porcins différents.



Image 4.1. Photos des différents échantillons solides. FPS est un fumier à base de sciure. FPP est un fumier à base de paille. Les fractions solides ont été obtenues après compression du lisier et le "solide à cœur" est un prélèvement réalisé au centre du tas de compost. Les sols correspondent aux prélèvements après épandage.

Les prélèvements ont été effectués en sortie de bâtiments, au moment où la litière est éliminée et stockée pour l'épandage, soit 3 à 6 semaines après l'installation de la litière propre. Ils ont été immédiatement livrés au laboratoire et traités dans les 24 heures.

Dans le cas de fumier sur paille, il a été brassé au laboratoire et un échantillon de 150 g environ a été découpé aux ciseaux puis re-brassé. Pour chaque fumier, trois prélèvements de 10 g environ ont été indépendamment broyés à l'ultra turax dans 20 mL de guanidine thiocyanate 4M-Tris-Cl pH 7,5, 0,1M, auquel ont été ajoutés 3 mL de N-Lauroyl sarcosine à 10 %. Quatre aliquotes de 500 µL par échantillon ont été congelés et conservés à -20 °C jusqu'au moment de l'extraction de l'ADN total.

4.2.2. Extraction de l'ADN total

Le protocole détaillé de l'extraction et de la purification de l'ADN total est donné par (Godon *et al.*, 1997). La lyse cellulaire se fait par chauffage (à 70°C pendant 1h) puis par action mécanique de micro-billes de zirconium dans un vibro-broyeur (10 min). Les inhibiteurs de PCR (acides humiques) sont éliminés par des lavages successifs au PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). L'ADN est ensuite précipité à l'isopropanol et les acides nucléiques sont récupérés par centrifugation (15 min, 15000 rpm). Le culot est repris avec de l'eau ultra-pure et 1 mg/mL de RNase A. Il est incubé 30 min à 37°C pour dégrader les ARNs. Le mélange est finalement purifié sur micro-colonne Quiagen® (kit QIAamp). L'ADN ainsi purifié est élué dans 50 µL de tampon (EB) et conservé à -20°C.

Une estimation de la qualité et de la quantité d'ADN obtenu est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 % dans un tampon de migration (TBE 1X) en présence de bromure d'éthidium (BET) permettant la visualisation de l'ADN sous UV. La taille et la concentration des fragments d'ADN obtenus sont évaluées par comparaison avec le marqueur λ *Hind* III.

4.2.3. Construction des banques ADNr 16S/18S.

Les ADNr 16S procaryotes ont été amplifiés sur toute leur longueur par PCR à l'aide de l'**amorce universelle W02** (position R1492-1509² chez *E. coli*) et d'une seconde amorce spécifique, **soit W18 pour les bactéries** (position F9-27 chez *E. coli*), **soit**

² La position F signifie Forward (sens) et R signifie Reverse (antisens).

W17 pour les archées (position F3-22 chez *E. coli*). Les ADNr 18S eucaryotes ont été amplifiés partiellement avec les amorces w02 et W99 (position F528-544 chez *E. coli*) (Edgcomb *et al.*, 2002). L'ensemble des amorces utilisées pour les différentes PCR est présenté dans le **Tableau 4.3**.

Tableau 4.3. Séquences et cibles des différentes amorces utilisées dans cette étude.

Amorce	Séquence*	Cible
PCR sur l'ADN total :		
W02	5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3'	ADNr 16S universel (Godon <i>et al.</i> , 1997)
W18	5'-GAGTTTGATCMTGGCCAG-3'	ADNr 16S <i>Bacteria</i> (Godon <i>et al.</i> , 1997)
W17	5'-ATTCYGGTTGATCCYGSCRG-3'	ADNr 16S <i>Archaea</i> (Godon <i>et al.</i> , 1997)
W99	5'-CGGTAATTCCAGCTCC-3'	ADNr 18S <i>Eucarya</i> (Edgcomb <i>et al.</i> , 2002)
PCR sur colonie :		
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	ADN plasmidique (Godon <i>et al.</i> , 1997)
P13	5'-GACCATGATTACGCCAA-3'	ADN plasmidique (Godon <i>et al.</i> , 1997)
PCR - SSCP :		
W34	TET-5' TTACCGCGCTGCTGGCAC-3'	ADNr 16S universel (Zumstein <i>et al.</i> , 2000)
W49	5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3'	ADNr 16S <i>Bacteria</i> (Zumstein <i>et al.</i> , 2000)
W36	5'-TCCAGGCCCTACGGGG-3'	ADNr 16S/V3 <i>Archaea</i> (Zumstein <i>et al.</i> , 2000)
PCR de la réaction de séquence :		
W31	5'-TACCGCGCTGCTGGCAC-3'	ADNr 16S universel/région V3 (Zumstein <i>et al.</i> , 2000)

(*) S=G/C, M=A/C, N=A/T/G/C, Y=T/C, R=A/G, S=G/C.

Les mélanges réactionnels des réactions de PCRs sont décrits dans le **Tableau 4.4**.

Tableau 4.4. Réactifs pour les différentes réactions de PCR.			
Réactif	PCR-SSCP ¹	PCR sur l'ADN total ²	PCR sur colonie ²
Enzyme polymérase	0,5 µL soit 1,25 U	1 µL soit 2,5 U	0,5 µL soit 1,25 U
Tampon	5 µL à 10X	5 µL à 10X	2 µL à 10X
dNTP	4 µL à 2,5 mM,	4 µL à 2,5 mM,	1,6 µL à 2,5 mM,
Amorce w02	---	2 µL à 100 ng/µL ^a	---
Amorce w17	---	2 µL à 100 ng/µL ^b	---
Amorce w18	---	2 µL à 100 ng/µL ^c	---
Amorce w99	---	2 µL à 100 ng/µL ^d	---
Amorce w34	1,3 µL à 100 ng/µL	---	---
Amorce w49	1,3 µL à 100 ng/µL	---	---
Amorce P13	---	---	0,8 µL à 100 ng.µL ⁻¹
Amorce T7	---	---	0,8 µL à 100 ng.µL ⁻¹
ADN	1 µL	1 µL	1 colonie ³
Eau ultra pure	qsq 50 µL	qsq 50 µL	qsq 20 µL

1. Type de polymérase : *Pfu Turbo*[®].

2. Type de polymérase : *Red Taq*[®]. Les couples d'amorces utilisés pour amplifier les ADNr de chaque domaine sont :

a et b = couple d'amorces pour l'amplification des ADNr 16S *Bacteria*.

a et c = couple d'amorces pour l'amplification des ADNr 16S *Archaea*.

a et d = couple d'amorces pour l'amplification partielle des ADNr 18S *Eucarya*.

3. Apportée avec une pointe de cône.

Les conditions d'amplification choisies sont les suivantes :

- Une dénaturation initiale de 2 min à 94°C.
- 25 cycles d'amplification pour les bactéries (30 cycles pour les archées et les eucaryotes) comprenant une étape de dénaturation de 1 min. à 94°C, une étape d'hybridation de 1 min. et une étape d'élongation de 1 min. à 72°C. Les

températures d'hybridation sont 50, 55 et 46°C pour les bactéries, les archées et les eucaryotes respectivement.

- Une élongation finale de 10 min. à 72°C.

Les produits de PCR ont été séparés des amorces non incorporées par purification sur micro-colonne Quiagen® (kit QIAamp). La qualité et la quantité des produits de PCR obtenus ont été évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 % comme décrit ci-avant.

Deux protocoles de clonage ont été utilisés au cours de l'étude :

- **Les banques PIMALC et PIMALE *Bacteria*, PIMADF *Archaea* et PIMAEC *Eucarya* du lisier de porc** ont été réalisées à l'aide du kit de clonage TopoTA cloning kit (Invitrogen®). Pour chaque clonage, les produits de 5 PCRs indépendantes ont été mélangés et un aliquote a été utilisé pour la ligation dans le plasmide pGEMT comportant un gène de résistance à la kanamycine et le gène tueur *ccdB* (gène « killer »). Les cellules compétentes TOP10 *E.coli* ont été transformées et les clones recombinants ont été sélectionnés et purifiés sur milieu solide LB (Luria Broth Agar) avec Kanamycine (25 mg/mL).
- **La banque PIMALD *Bacteria* et toutes les banques concernant les fumiers de porc** ont été faites à l'aide du kit de clonage Promega en suivant le protocole de ligation et de transformation donné par Life Technologies. Dans ce kit, le plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline et possède la région codant pour l' α -peptide de la β -galactosidase. Les cellules compétentes (DH10B, Promega) possèdent le marqueur $\phi 80dlacZ\Delta M15$ permettant l' α -complémentation du gène de la β -galactosidase du plasmide. Les clones transformants sont sélectionnés et purifiés sur milieu solide LB (Luria Agar) avec ampicilline (50 mg/mL), les recombinants sont triés par distinction des colonies bleues ou blanches sur milieu contenant de l'Xgal et de l'IPTG.

L'efficacité des clonages a été testée par amplification des inserts d'une douzaine de clones recombinants par **PCR sur colonie** avec les amorces T7-P13 (**Tableau 4.3 et 4.4**) et vérification de la taille de l'insert sur gel d'agarose 0,7 %. Seuls les clonages présentant plus de 80 % des clones avec un insert de taille correcte ont été conservés.

La diversité des ADNr16S *Archaea* et eucaryotes étant moindre que celle des bactéries, les clones recombinants *Archaea* et eucaryotes ont été triés par analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) des inserts. Les produits de PCR sur colonie obtenus ci-dessus ont été découpés par restriction *HaeIII* – *EcoRI*. Les profils de restriction obtenus ont été analysés par migration sur gel d'agarose 2 % en comparaison avec le marqueur de taille 100 pb (Sigma). Les clones présentant des profils identiques ont été regroupés dans une même classe. Par la suite, deux clones de chaque classe ont été séquencés afin de vérifier la cohérence du classement.

Les clones recombinants ont été stockés en microplaques 96 puits contenant du milieu YT-Glycérol 5 % supplémenté en antibiotique (Kanamycine ou Ampicilline). Les microplaques, inoculées à l'aide de cure-dents stériles, ont été incubées une nuit à 37°C avant d'être stockées à –80°C.

4.2.4. Séquençage et analyse phylogénétique

Le séquençage a été réalisé sur **les produits** de PCR T7-P13 obtenus par PCR sur colonies de clones recombinants frais ou stockés. Ces produits de PCR ont été **quantifiés** sur gel d'agarose à 2 % en utilisant le marqueur de taille « Low DNA Mass™ ladder ». Puis, ils (entre 30 et 90 ng d'ADN) ont été **purifiés** afin d'éliminer les amorces non incorporées et les fragments d'ADN simples brins. Pour cela, un traitement enzymatique par l'Exonucléase I (USB) et la Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP-USB) a été effectué pendant 15 min à 37°C. Les enzymes furent ensuite inactivées par élévation de la température (80°C pendant 15 min).

Les **réactions de séquence** ont été effectuées par la méthode de (Sanger *et al.*, 1977) à l'aide du kit Abi prism™ Dye Terminator de la société Perkin Elmer et les amorces : w31 (position R500-482 chez *E. coli*) pour les domaines procaryotes et P13 ou T7 pour le domaine eucaryote. Le **Tableau 4.5** décrit les conditions de PCR pour cette réaction.

Tableau 4.5. Paramètres de l'amplification par PCR sur colonie, pour la SSCP et pour le séquençage.

		PCR-SSCP		PCR sur colonie		PCR de séquençage	
ETAPE :		Température	Durée	Température	Durée	Température	Durée
Dénaturation initiale		94°C	2 min	94°C	10 min	---	---
Dénaturation	Cycle	94°C	30 s	94°C	1 min	96°C	10 s
Hybridation		61°C	30 s	55°C	1 min	50°C	5 s
Elongation		72°C	30 s	72°C	1 min	60°C	4 min
Elongation finale		72°C	10 min	72°C	10 min	---	---
Nombre total de cycles		25		30		25	

Les produits d'extension de la réaction ont été purifiés par précipitation de l'ADN à l'éthanol - acétate (3M) pour éliminer notamment les ddNTP marqués (termineurs d'élongation) présents en excès. Le protocole détaillé a été décrit précédemment (Godon *et al.*, 1997). Les produits purifiés ont été analysés par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide-urée (Long Ranger, Tebu®) permettant la séparation des molécules d'ADN à une base près. La migration a été effectuée sur un séquenceur automatique ABI 373A Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA, USA) en utilisant les paramètres suivants : 17 heures, 2500 V, 40 mA, 42 W.

Les séquences partielles d'environ 500 bp pour les domaines *Bacteria* et *Archaea* (position 103 à 623 chez *E. coli*) et de 900 pb pour le domaine *Eucarya* (position 528 à 1492 chez *E. coli*) ont été obtenues à partir des clones. **Elles ont été comparées** entre elles et avec les séquences présentes dans les bases de données Genbank et EMBL grâce au logiciel BLAST (National Center for Biotechnology Information, NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et la Ribosomal Database Project (RDP-II) (Altschul *et al.*, 1997 ; Maidak *et al.*, 2001) **afin de déterminer la famille**, le genre ou la bactérie la plus proche phylogénétiquement. Enfin les séquences analysées, ainsi que leurs plus proches relatives dans Blast, ont été traitées avec le logiciel, ARB (Strunk et Ludwig,

1997). Ce logiciel permet de réaliser une étude phylogénétique par intégration des séquences analysées à un arbre phylogénétique établi avec des séquences d'espèces déjà identifiées. Les séquences (ADNr 16S ou 18S) ont été alignées avec environ 12,000 séquences complètes et partielles dans les banques de données en utilisant les outils automatiques d'ARB (Clustalw). Les alignements obtenus ont été corrigés manuellement par comparaison avec les séquences les plus proches et en accord avec les structures secondaires de la molécule. Les séquences ont alors été réincorporées dans l'arbre général par la méthode de parcimonie. Pour chaque sous-groupe phylogénétique, les distances phylogénétiques ont été calculées à partir d'une matrice de distance réalisée avec la correction de Jukes Cantor et les séquences présentant une divergence maximale de 3 % ont été groupées en phylotypes (Jukes et Cantor, 1969). Finalement, des arbres phylogénétiques consensus ont été de nouveau construits par la méthode de neighbor-joining et un retraitage (bootstrap) de 1000 essais pour confirmer les positions des branches des séquences analysées (Saitou et Nei, 1987).

Les séquences chimériques ont été recherchées par comparaison des résultats obtenus par analyse des portions 5' et 3' des séquences avec ceux obtenus par analyse des séquences totales, ainsi que par l'analyse des séquences avec le programme CHECK CHIMERA (RDP - II).

4.2.5. L'analyse SSCP

La SSCP est une technique qui permet de séparer des fragments d'ADN de même taille mais de séquence différente selon leur migration dans un gel de polyacrylamide non dénaturant. La migration est déterminée par la composition en bases des fragments d'ADN (donc leur séquence) qui va créer une structure secondaire spécifique et conduire à une vitesse de migration différente pour chacun des fragments. **Appliquée à la région V3 de l'ADNr 16S**, elle permet d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens où chaque pic d'ADN observé par SSCP représente une espèce moléculaire. La comparaison des profils entre eux permet de visualiser rapidement les changements de diversité des communautés microbiennes.

L'identification des pics s'effectue par clonage de la région V3 des ADNr 16S et tri par SSCP des clones recombinants. Les clones présentant un insert dont le profil

SSCP co-migre avec un pic du profil total de la communauté sont alors séquencés (Fig. 4.4).

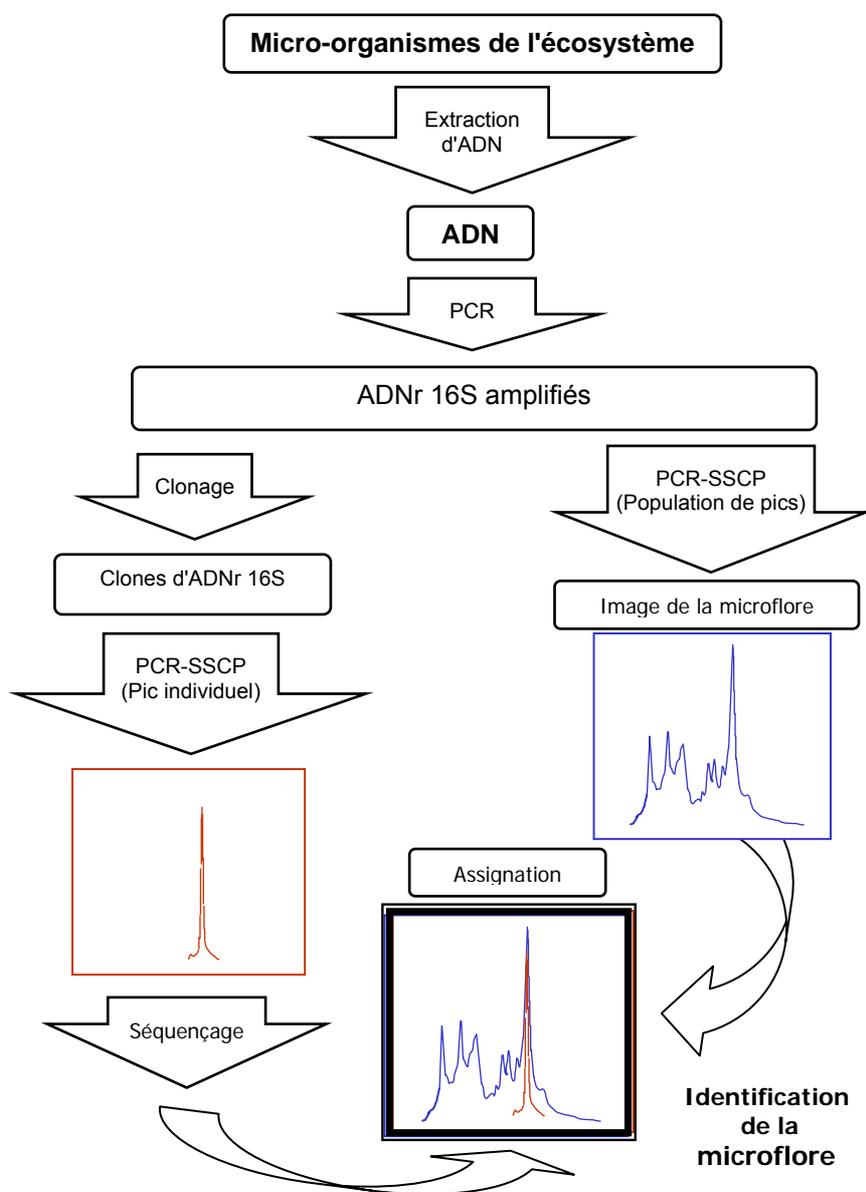


Figure 4.4. Les différentes étapes de l'identification des espèces microbiennes par SSCP.

4.2.5.1. Amplification de la région V3 de l'ADNr 16S

Après extraction de l'ADN total, l'amplification de la région V3 de l'ADNr 16S a été effectuée en utilisant l'amorce **W34** (position R515-533 chez *E. coli*) ainsi que l'amorce **W49** (position F329-348 chez *E. coli*) pour les populations *Bacteria* (180-200

pb) ou l'**amorce W36** (position F333-348 chez *E. coli*) pour les populations *Archaea* (160 pb). L'**amorce W34** est marquée à l'extrémité 5' par un fluorophore (fluorescéine phosphoramidite, TET) servant à la détection du fragment lors de l'électrophorèse SSCP. L'ADN polymérase utilisée fut la *Pfu* Turbo (1U/50 µL final) car elle permet d'obtenir des fragments d'ADN à bouts francs. Les conditions de réaction et d'amplification ont été présentées dans les **tableaux 4.4 et 4.5**.

4.2.5.2. Préparation des amplicons pour l'analyse SSCP

Un µL de produits de PCR a été mélangé à 18,5 µL de formamide (Genescan-Applied Biosystems) et 0,5 µL d'un étalon interne (rox, Genescan-Applied Biosystems). L'ADN a été dénaturé par chauffage (5 min à 95°C) puis refroidi rapidement (10 min. dans de l'eau glacée) pour créer des molécules simples brins de conformation secondaire stable par appariement au niveau de zones de séquences complémentaires. Les différentes molécules ont été séparées par électrophorèse capillaire et détectées grâce au marquage de l'amorce w34. L'électrophorèse a été effectuée à l'aide d'un séquenceur automatique Abi prism 310 Perkin Elmer (Applied Biosystems) équipé d'un capillaire de 47 cm x 50 µm rempli de polymère composé de 5,6 % GeneScan polymère (Applied Biosystems), 10 % glycérol et 1 X TBE. Les conditions de migration étaient : 12 kV et 32°C pendant 30 min. par échantillon. Le re-callage des migrations en fonction du marqueur de taille et l'analyse des résultats ont été faits avec le logiciel GeneScan® 3.1.

4.2.6. La PCR en temps réel ou quantitative (PCRq³)

Le principe de la PCR est de dupliquer l'ADN par l'utilisation d'amorces choisies en bordure de la séquence cible à amplifier et l'application de cycles successifs de dénaturation, hybridation des amorces et réplication de l'ADN *in vitro*. Ces réactions en chaîne permettent un doublement du nombre de molécules cibles à chaque cycle et conduisent à une amplification exponentielle de l'ADN. La critique majeure soulevée à l'encontre de cette technique est son manque de quantitatativité. En effet, dans son utilisation classique, seuls les produits finaux de la réaction sont observés et la forte capacité d'amplification de la réaction peut conduire à la production d'une même quantité d'ADN final à partir de quantités de cibles très différentes.

³ PCR TaqMan, PCR en temps réel et PCR quantitative sont des synonymes.

Le principe de la PCR en temps réel consiste à mesurer en direct la quantité d'ADN produit en fonction du nombre de cycles effectués de manière à évaluer la phase exponentielle d'amplification de l'ADN, période où le nombre de molécules amplifiées est proportionnel au nombre de molécules cibles. La façon la plus directe serait de prélever un aliquote de la PCR à chaque cycle et d'effectuer une quantification directe de chacun de ces aliquotes. Cette approche a été rendue possible par le développement, vers la fin des années 1990, d'appareils permettant de détecter en ligne, par fluorescence, la quantité d'ADN produit à chaque cycle. Ainsi, au cours de la PCR, les données concernant la quantité du produit amplifié sont enregistrées en temps réel. Il est alors possible d'étudier en parallèle des échantillons ayant des nombres de copies initiaux très différents, de l'ordre de plusieurs log, sans avoir à faire des dilutions préliminaires.

2.2.6.1. Les méthodes de détection des produits amplifiés

Il existe deux technologies pour détecter les produits de la PCR en temps réel. Ils sont marqués, soit par une molécule fluorescente qui se fixe à l'ADN (le **Sybr Green I**), soit par un oligonucléotide spécifique portant un fluorophore et appelé **sonde** (**Figure 4.5 et 4.6**).

Le Sybr Green I est un fluorophore intercalant de l'ADN qui agit comme le BET (Bromure d'Ethidium). En solution, le SYBR Green est sous sa forme libre et n'est pas fluorescent. Lorsqu'il se lie à l'ADN double brin, il devient très fluorescent. Au début de **l'amplification avec le Sybr green I**, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle augmente proportionnellement au nombre de copies, elle est donc directement liée à la quantité initiale d'ADN cible et au nombre de cycles de PCR (**Figure 4.5**). Le Sybr green I est très stable, seulement 6 % de son activité est perdue au bout de 30 cycles d'amplification.

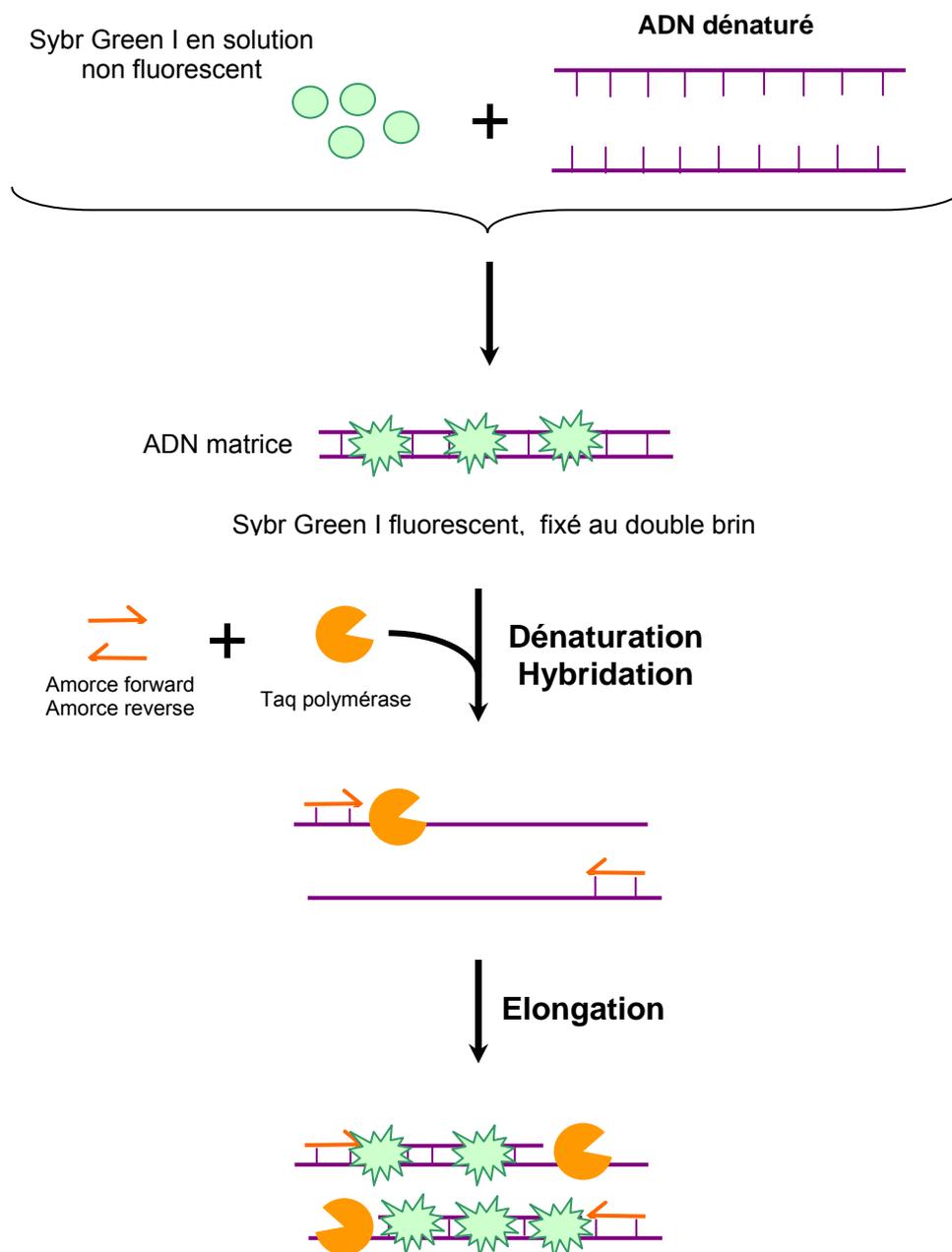


Figure 4.5. Principe de la PCR en temps réel avec le Sybr Green.

La méthode de détection à partir d'une sonde a été proposée par (Holland *et al.*, 1991). Elle est basée sur l'utilisation de l'activité exonucléasique 5'-3' de l'enzyme **Taq polymérase** pour le développement d'une méthode de détection en ligne des produits de PCR. Puis, d'autres auteurs (Lee *et al.*, 1993 ; Witham *et al.*, 1996) ont suggéré l'utilisation d'une **sonde marquée** des deux côtés avec des fluorophores pour la détection de l'ADN du virus de la Murine-leucemia et de la toxine shiga-like d'*E. coli*, respectivement (**Fig. 4.6**).

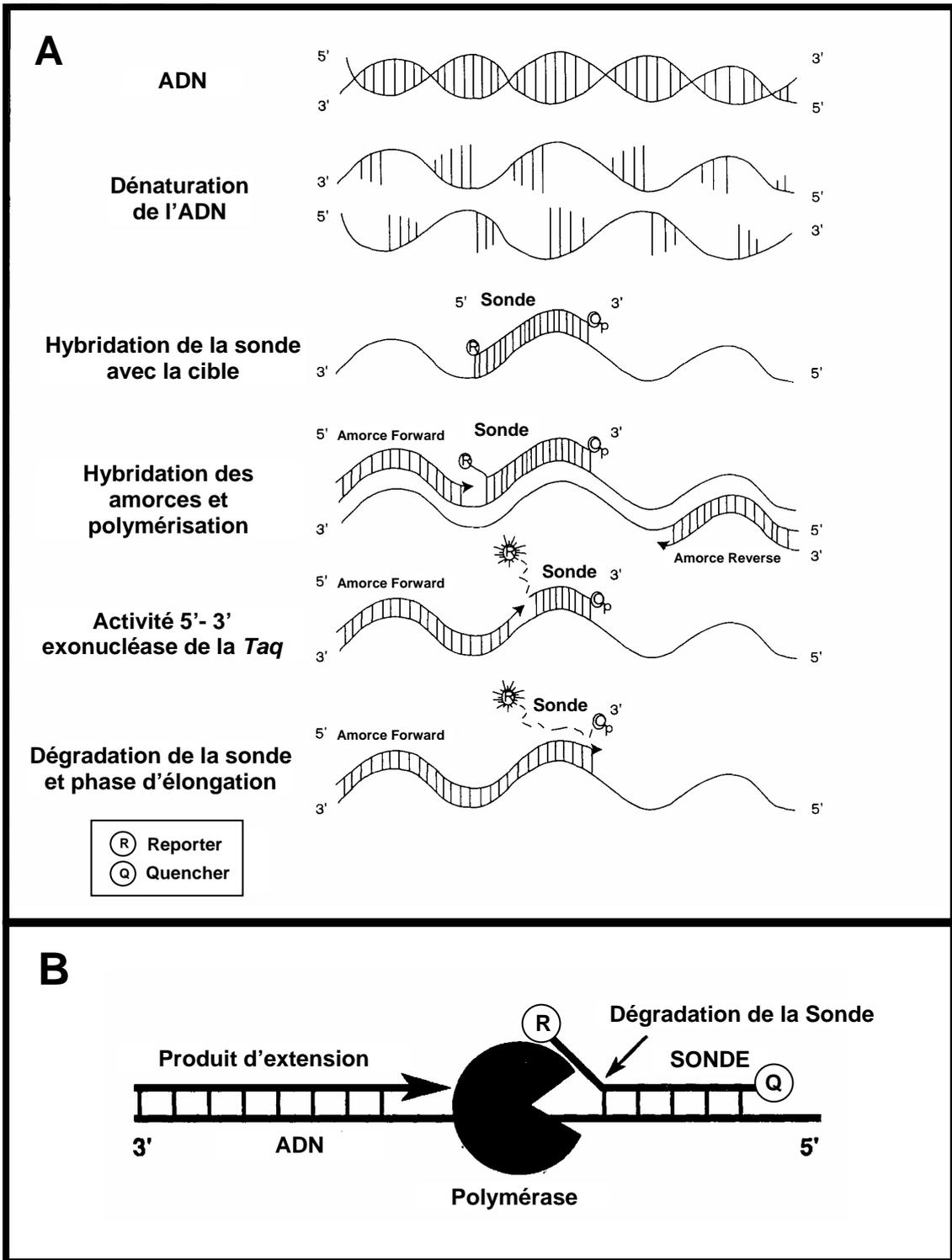
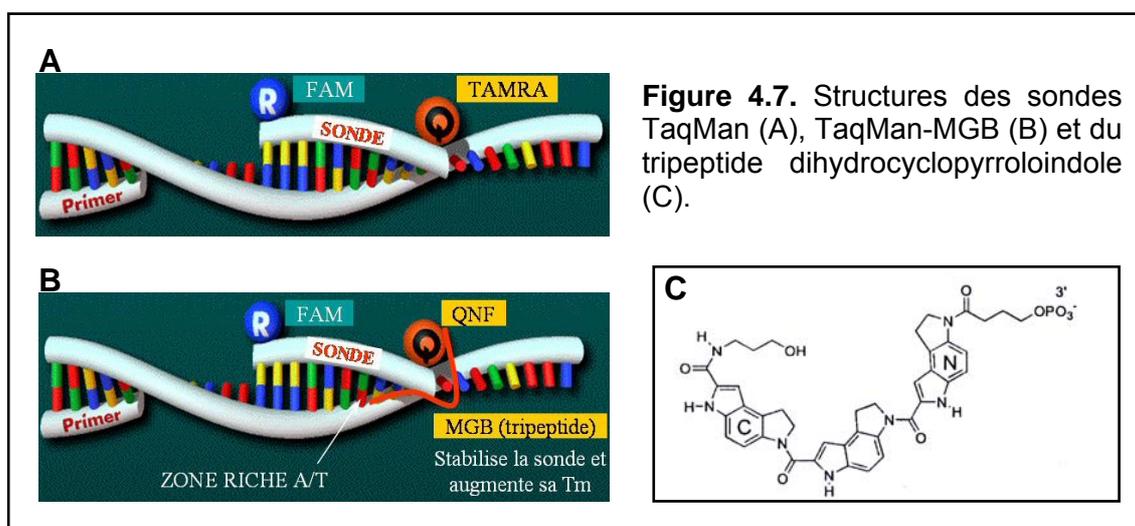


Figure 4.6. Etapes de la PCRq (A) et dégradation d'une sonde de type TaqMan (B).

Deux types de sondes nucléotidiques sont utilisés pour la réaction d'amplification de la PCR. La sonde de type **TaqMan** est spécifique d'une partie interne au fragment d'ADN amplifié. Cette sonde est marquée à l'extrémité 5' par une molécule fluorescente ou fluorophore appelée « Reporter⁴ » et à l'extrémité 3' par un autre type de fluorophore appelé « Quencher⁵ » (**Fig 4.7A**). Le spectre d'émission du Reporter chevauche le spectre d'excitation du Quencher, donc l'émission du Reporter est atténuée ou « quenchée » (éteinte) par la proximité du Quencher⁶. Lorsque les fluorophores ne sont plus reliés entre eux, l'émission de fluorescence du Reporter est augmentée. Cette technique présente l'avantage d'être plus spécifique que le marquage au Sybr green I, car une sonde supplémentaire est introduite.

Les sondes **TaqMan-MGB (Minor Groove Binder)** possèdent, en plus du Reporter et de son Quencher, un tripeptide associé à leur extrémité 3'. Ce tripeptide a la propriété de se fixer dans le petit sillon des zones de l'ADN riches en A/T, ce qui conduit à une stabilisation du complexe sonde - ADN (**Fig 4.7B**).



Le tripeptide augmente le Tm⁷ de la sonde pour sa cible permettant ainsi l'utilisation de sondes plus petites d'une taille entre 13 et 20 nucléotides⁸. Cette réduction de la taille

⁴ Généralement, cette molécule est la 6-Carboxyfluorescéine (6-FAM).

⁵ Généralement, la tetramethylrhodamine (TAMRA).

⁶ Le Quencher a la propriété d'absorber l'énergie émise par le reporter, cette capacité est communément appelée FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*).

⁷ Tm (melting temperature), indique la température de dissociation des brins de l'ADN pendant la PCR.

⁸ Une sonde TaqMan-MGB de 12 nucléotides a le même Tm (65°C) qu'une sonde non MGB 27 mer.

des sondes rend l'hybridation plus sensible aux mésappariements (mismatches) surtout si celui-ci est placé au site de fixation du MGB (kutyavin *et al.*, 2000).

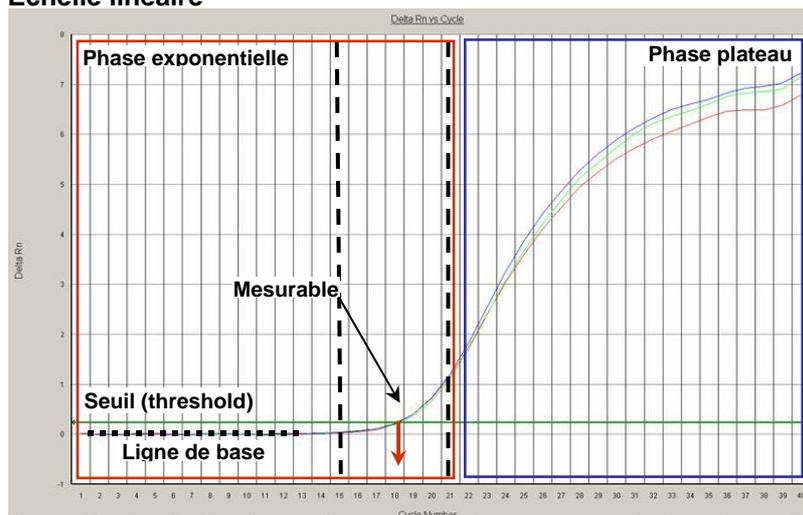
4.2.6.2. La réaction et ses paramètres

La réaction d'amplification par PCRq soit avec le Sybr Green I, soit avec une sonde TaqMan, suit les mêmes étapes qu'une PCR classique ou qualitative, c'est-à-dire, dénaturation, hybridation, extension (**Fig. 4.7**). En revanche, à la différence d'une PCR classique, elle utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel. La mesure et la visualisation de l'amplicon est liée à l'émission de fluorescence à chaque cycle PCR dû, soit à la fixation du Sybr green sur l'ADN, soit à l'activité exonucléasique 5'-3' de l'enzyme *Taq* polymérase qui dégrade tout oligonucléotide se trouvant sur son passage. La dégradation de la sonde va libérer sa fluorescence qui est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

L'analyse de la courbe d'amplification va permettre de déterminer le nombre de gènes cibles présents au début de la réaction. Un **seuil (threshold en anglais)** de détection du signal est choisi manuellement (**Figure 4.8 : Échelle linéaire**). Il correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que la courbe d'amplification de l'ADN soit en phase exponentielle mais assez élevé pour être au-dessus du bruit de fond. Son positionnement dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification est important car seule cette partie de la courbe est représentative du nombre de copies initiales.

Lorsque la courbe d'amplification est visualisée sur une échelle logarithmique, la ligne du seuil est normalement fixée au milieu de la phase linéaire de la courbe. L'intersection de la courbe et du seuil désigne un cycle (point en abscisse) à partir duquel l'augmentation de la fluorescence devient constante. Ce cycle est nommé **Ct**, threshold cycle en anglais. Le **Ct** est inversement proportionnel au nombre initial de copies de la séquence ciblée et amplifiée (Heid *et al.*, 1996) (**Fig. 4.8 : Échelle logarithmique**).

Échelle linéaire



Échelle logarithmique

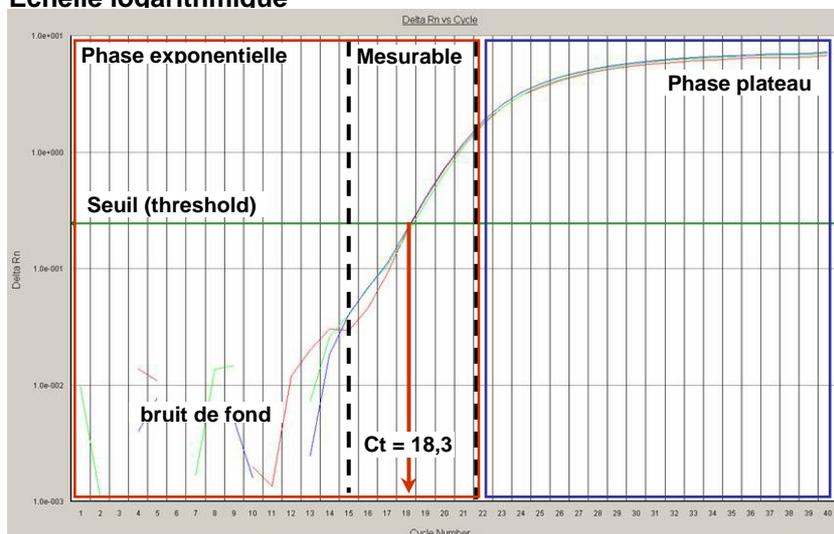


Figure 4.8. Représentations d'une amplification par PCR d'un fragment d'ADN. L'axe des abscisses correspond au nombre de cycles (40). L'axe des ordonnées correspond à l'augmentation de la fluorescence (ΔRn) qui est directement proportionnelle à la quantité du produit amplifié (échelle logarithmique). La ligne du seuil est normalement fixée au milieu de la phase exponentielle mesurable dans l'échelle linéaire. La ligne de base se place entre le cycle 1 et 5 cycles avant le Ct . La partie de 1 à 22 cycles correspond à la phase exponentielle, elle contient une phase de bruit de fond (1 à 15 cycles) et une phase mesurable de 15 à 22 cycles. La partie de 22 à 40 cycles correspond à la phase plateau. L'intersection de la courbe et du seuil donne un point ayant pour abscisse la valeur de 18,3 cycles

Si on a deux échantillons avec un nombre de copies d'ADN différent, on obtiendra 2 Ct différents. Si des dilutions successives sont effectuées, il est possible d'obtenir des courbes d'amplification décalées successivement vers la droite et dont les Ct sont

successivement augmentés d'une valeur constante, c'est-à-dire comme une droite étalon (**Fig. 4.9**).

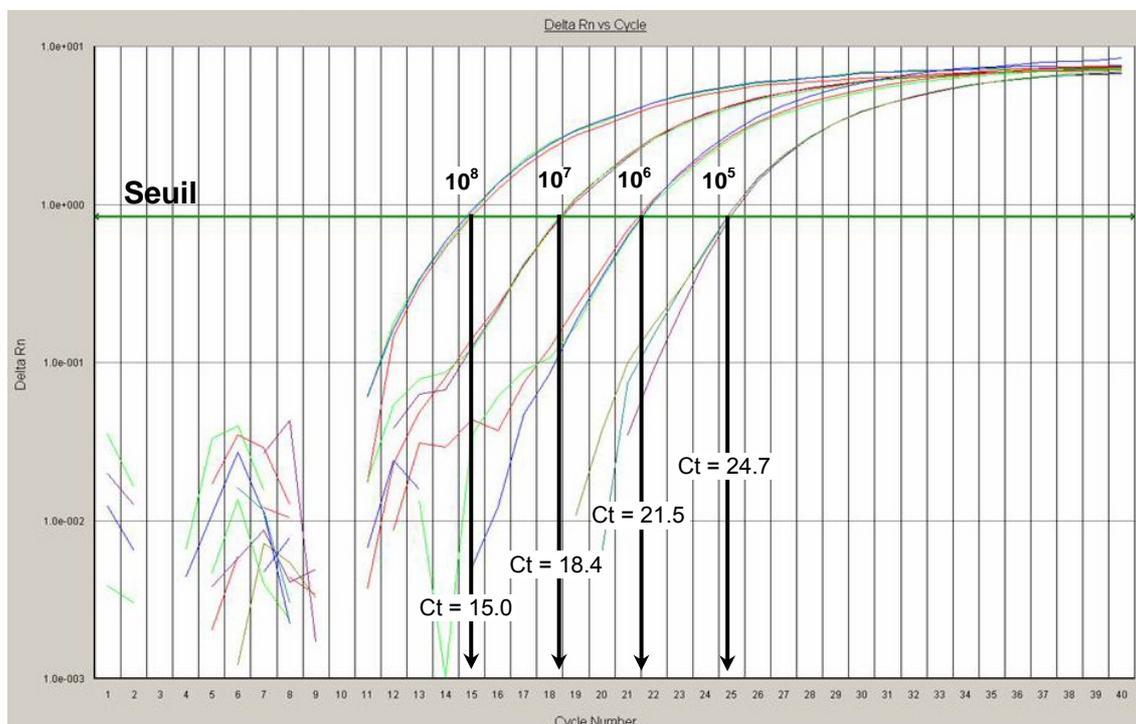


Figure 4.9. Représentation en échelle logarithmique d'amplifications par PCR de 4 dilutions d'un ADN de référence ou standard. L'axe des abscisses correspond au nombre de cycles. L'axe des ordonnées correspond à l'augmentation de la fluorescence (ΔR_n). Pour chaque dilution, trois courbes sont représentées correspondant à trois réplicats.

En théorie le nombre de copies de la séquence ciblée double à chaque cycle, mais il est rare d'avoir un rendement de 100 %. Pour un échantillon dont le nombre de copies initial de la séquence ciblée est X_0 , la quantité X_n de produit obtenu après n cycles d'amplification est :

$$X_n = X_0 (1+R)^n \quad (\text{où } R \text{ est le rendement de la PCR, compris entre 0 et 1})$$

La PCRq permet de faire de la **quantification absolue** de la cible par rapport à un standard externe (détermination en nombre de copies). Si le nombre de molécules du standard est connu, alors une quantité absolue pourra être assignée à chaque échantillon et l'unité pourra être un nombre de copies ou un nombre de molécules.

4.2.7. Les systèmes de détection testés en PCR en temps réel

Réalisation des PCR et des droites étalons :

La quantification des échantillons de la filière d'élevage d'Albi a été réalisée par l'**essai de quantification absolue**. Cet essai a consisté à comparer les amplifications obtenues pour les échantillons inconnus avec celles d'un ADN standard de référence. **Les échantillons inconnus** ont été amplifiés en triple ou plus. Les droites étalons ont été réalisées à partir d'au moins cinq quantités croissantes de **standards** amplifiés en triple ou plus. Les réactions de PCR sont présentées ci-après. Tous les échantillons inconnus ont donné des valeurs comprises dans la courbe étalon. Un **témoin négatif** à base d'eau stérile a été amplifié en double ou en triple comme contrôle.

La répartition des échantillons, standards et témoins dans une plaque de 96 puits pour un essai de quantification absolue est présentée dans la **Figure 4.10**.

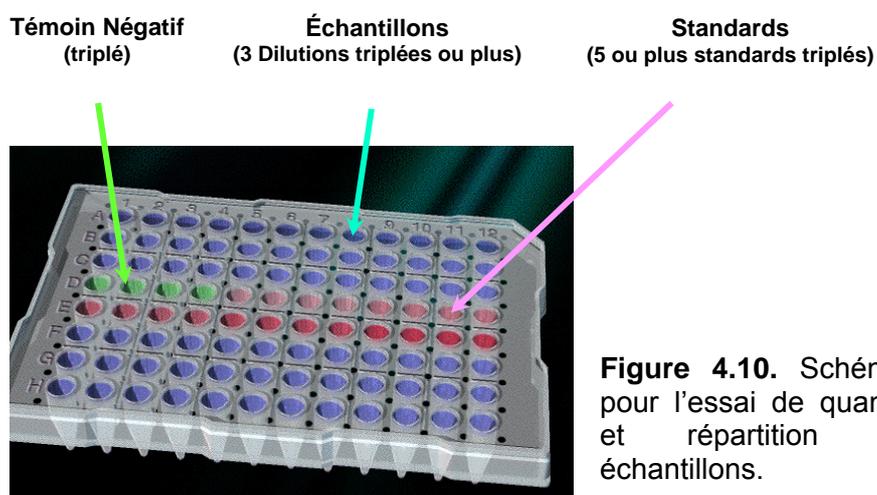


Figure 4.10. Schéma d'une plaque pour l'essai de quantification absolue et répartition des différents échantillons.

La droite étalon a été faite à partir d'ADN quantifié avec un appareil GENEQUANT-pro (Amersham Biosciences) en utilisant un capillaire pour prélever l'échantillon selon le protocole fourni par le constructeur. Ce standard a été dilué, ensuite aliquoté et congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à son utilisation (**voir Annexes : Tableau a4.1**). Chaque aliquote ($50\text{ }\mu\text{L}$) a été utilisé une seule fois. La courbe étalon donne l'efficacité de la PCR et la corrélation entre le Ct et le logarithme de la concentration de l'ADN de chaque standard ou référence (**Figure 4.11**). La **Figure 4.11** montre une courbe étalon

typique avec une **efficacité de 99 %** et un **coefficient de corrélation de 0,995**. Mais c'est l'efficacité de la PCR qui est le paramètre le plus important car elle indique que la réaction PCR n'a pas été affectée pas des inhibiteurs.

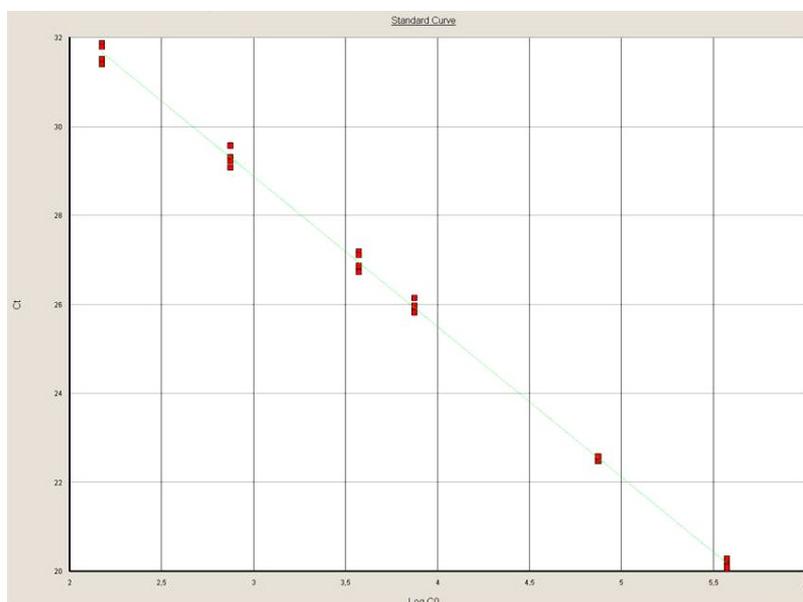


Figure 4.11. Courbe étalon d'un essai de PCRq. L'axe des abscisses correspond au logarithme de la concentration de chaque standard. L'axe des ordonnées correspond aux Ct de chaque standard.

Finalement le logiciel ABI Prism calcule la concentration d'ADN des échantillons inconnus par rapport aux standards. Les amplifications ont été réalisées et analysées avec le **thermocycleur ABI Prism 7000 Sequence Detection System** (Applied Biosystems).

Les trois systèmes de détection testés pendant la réalisation de cette étude :

Un système pour la détection d'un indicateur de contamination fécale de porcs (PIMA1) dessiné à partir du clone PIMALC07 observé dans le lisier de porcs d'élevage et apparenté à *Streptococcus alactolyticus* (99 % de similarité). Tous les aspects techniques du développement de ce système et de son application aux échantillons de la filière porcine à Albi font l'objet du chapitre 7.

Un second système pour la détection de *Enterococcus* spp. publié par (Frahm et Obst, 2003) a été utilisé dans le but de quantifier le nombre d'entérocoques présents dans les échantillons de la filière porcine d'Albi et de comparer les résultats obtenus avec les numérations culturales classiques réalisées par le groupe du Dr. Brugère à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse sur les mêmes échantillons. **Les amorces et la sonde de ce système** sont présentées dans le **Tableau 4.6**. Ce système amplifie un fragment d'ADN qui correspond à une partie du gène 23S et de l'inter-région 16S - 23S de l'opéron *rrn* (voir **Fig. 2.2**).

Tableau 4.6. Séquences et positions des amorces et de la sonde du système *Enterococcus*.

Oligos	Séquence	Position (<i>E. coli</i>)
W110	5'-AGAAATTCCAAACGAACTTG-3'	Forward, position 784 à 803
W111	5'-CAGTGCTCTACCTCCATCATT-3'	Reverse, position 834 à 854
W161 ^a	5'-(6-Fam) TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA (Tamra)-3'	Sonde, position 813 à 841

^a La sonde est du type Taq-Man.

Les standards nécessaires à la réalisation de la droite étalon du système *Enterococcus* ont été construits à partir de l'ADN extrait du lisier de porcs utilisé pour l'inventaire (Porcherie de La Pomarède). Le fragment cible du système (70 pb) a été amplifié par PCR avec les amorces W110 et W111 puis cloné dans un plasmide d'*E.coli* avec le kit de clonage Invitrogen® (**Figure 4.12**). L'insert a été amplifié 5 fois à partir d'un clone purifié et les produits PCR ont été groupés et purifiés. Cet ADN purifié a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre pour être ensuite soumis à une dilution logarithmique, de façon à obtenir les standards de 10⁰ à 10⁹ copies de cible par volume de réaction PCRq (25 µL) lors des essais de quantification absolue.

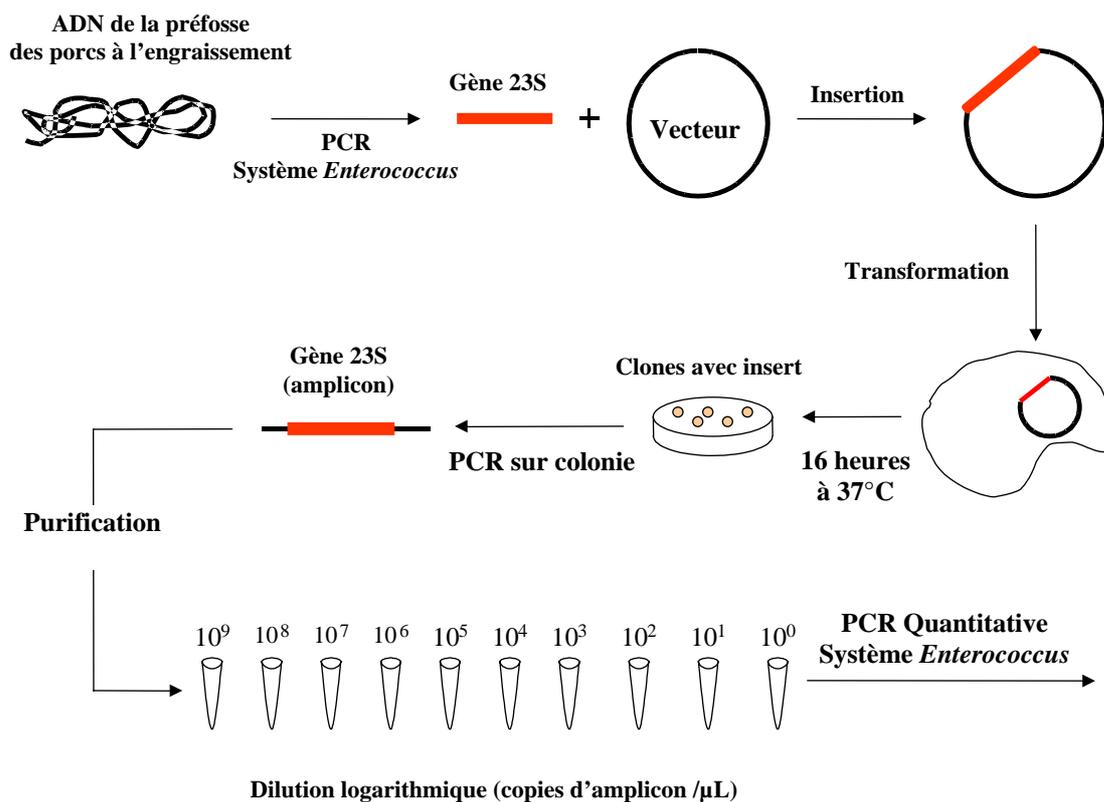


Figure 4.12. Schéma de l'élaboration des standards de la droite étalon du système *Enterococcus*.

La droite étalon du système *Enterococcus* a été réalisée en utilisant les réactifs et concentrations qui correspondent à la réaction PCRq de ce système de détection (**Tableau 4.7**).

Tableau 4.7. Réactifs pour la réaction PCRq du système *Enterococcus* (essai de quantification absolue).

Réactifs :	Concentration finale (nM)	1 échantillon (µL)
Master mix (enzyme + tampon + dNTP)	n.a.	12.5
Eau ultrapure	n.a.	5.7
Sonde w161	200	1
Amorce forward w110	200	0.3
Amorce reverse w111	300	0.5
ADN	n.a.	5.0
Volume final de la réaction :		25 µL

n.a. ne s'applique pas.

Un troisième système pour la détection des gènes ribosomiques 16S totaux a été utilisé pour déterminer les quantités d'ADNr 16S totales des échantillons inconnus et permettre le suivi des proportions relatives des groupes microbiens mesurés avec les deux autres systèmes de détection. Les amorces et la sonde de ce système ont été publiées par (Suzuki *et al.*, 2000) (**Tableau 4.8**).

Tableau 4.8. Séquences et position des amorces et de la sonde du système de détection des ADNr 16S totaux.

Oligos	Séquence	Position (<i>E. coli</i>)
W102	5'-CGGTGAATACGTTTCYCGG-3'	Forward, 1369 à 1386
W105	5'-GGWTACCTTGTTACGACTT-3'	Reverse, 1492 à 1473
<u>W101</u> ^a	5'-(6-Fam) CTTGTACACACCGCCCGTC (Tamra)-3'	Sonde, 1389 à 1407

a = La sonde est de type Taq-Man.

La mise au point des concentrations de chaque oligonucléotide (sonde et amorces) et des conditions réactionnelles a été effectuée en suivant le protocole de (Rousselon *et al.*, (In press)) (**Tableau 4.9**).

Tableau 4.9. Réactifs pour la réaction PCR en temps réel du système de détection des ADNr 16S totaux.

Réactifs :	Concentration finale (nM)	1 échantillon (µL)
Master mix (enzyme+tampon+dNTP) [2X]	1X	12.5
Eau ultrapure	n.a.	4.5
Sonde w101	250 nM	1
Amorce forward w102	756 nM	1
Amorce reverse w105	500 nM	1
ADN (échantillon ou standard)	n.a.	5.0
Volume final de la réaction		25 µL

n.a. ne s'applique pas.

La droite étalon de ce système a été réalisée à partir du phylotype PIMALC197 isolé du lisier de porcs d'engraissement. Ce phylotype contenait plus de 5 % des séquences de l'inventaire *Bacteria* du lisier.

4.3. Description des techniques d'analyse physico-chimiques

4.3.1. Les mesures *in situ*

Le pH, le potentiel redox et la température du lisier ont été mesurés *in situ* avec un appareil Mettler-Toledo AG model 4300 équipé d'une électrode pH en verre ou d'une électrode redox intégrée (PT48056SC-DPAS-K8S/325) pour la mesure de la température et du potentiel redox.

4.3.2. Le prélèvement et la conservation des échantillons

Pour le lisier, plusieurs prélèvements de 300 mL ont été effectués en surface puis en profondeur de la préfosse et mélangés pour obtenir un prélèvement moyen afin de limiter les biais liés à l'échantillonnage (**Fig. 4.13**).

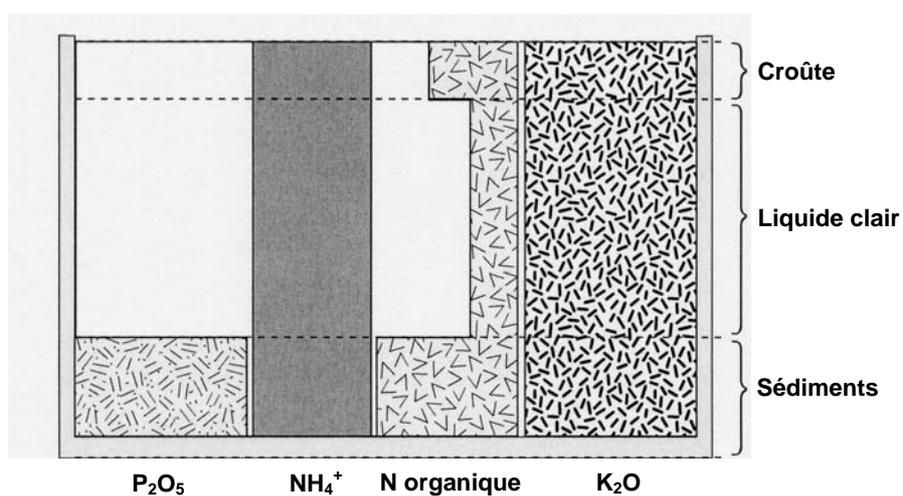


Figure 4.13. Sédimentation normale du lisier en fosse de stockage (Levasseur, 1998).

Pour chaque échantillon de lisier brut, la **fraction totale** a été analysée le jour même pour les paramètres suivants : DCO (demande chimique en oxygène), azote total

(NTK), N-ammoniacal et sulfure d'hydrogène. Des échantillons ont été stockés à -20°C pour le phosphore total (Fig. 4.14).

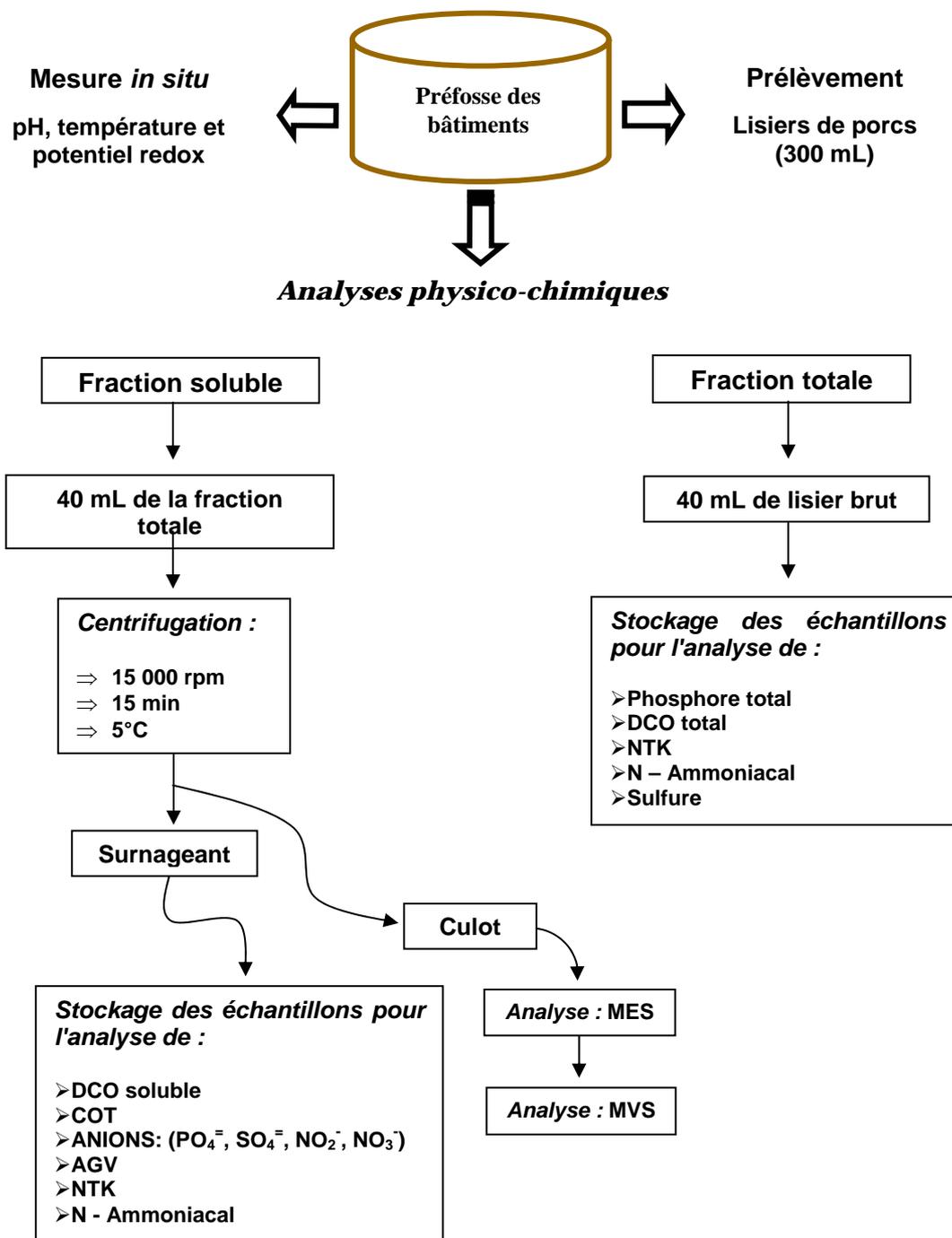


Figure 4.14. Schéma de la méthodologie utilisée pour l'analyse physico-chimique des échantillons de lisier de porcs, porcherie La Pomarède.

Pour la fraction soluble, 40 mL de chaque échantillon ont été centrifugés à 15 000 rpm pendant 15 min. à 5°C. Les surnageants ont été filtrés à 0,2 µm (filtres nitrocelluloses, Nalgène) puis stockés à 4°C en attendant des analyses suivantes : DCO, carbone total, C organique et C inorganique, acides gras volatiles (C2 à C5), NTK, N-ammoniacal, nitrites, nitrates, phosphates et sulfates (**Fig. 4.14**). Les culots ont été repris dans de l'eau stérile pour faire les mesures de matières en suspension (MES) et de matières volatiles en suspension (MVS).

Pour le fumier, un volume correspondant à une surface de 1 m² environ a été brassé sur site. Plusieurs prélèvements ont été effectués pour un poids total de 1 kg. Dans le cas du fumier sur paille, le kilogramme prélevé a été de nouveau brassé au laboratoire et un échantillon de 150 g environ a été découpé aux ciseaux puis re-brassé. Trois prélèvements de 10 g ont été indépendamment broyés à l'ultra turax avec 20 mL d'une solution PBS 1X. Ensuite les fractions totales ont été analysées pour la matière sèche (MS), l'humidité, la DCO, l'azote total, et l'N-ammoniacal. Les fractions solubles ont été obtenues en suivant la même méthodologie que pour le lisier et stockées à 4°C pour analyser la DCO, l'azote total, et l'N-ammoniacal, les acides gras volatiles, les nitrites, les nitrates, les phosphates et les sulfates.

4.3.3. Méthodes analytiques

La détermination des teneurs en **matières sèches (MS) et en matières en suspension (MES)** a été réalisée en triplicat par séchage jusqu'à poids constant à 105°C de : 10 mL d'échantillon de lisier, 10 g d'échantillon de fumier ou de sol, ou 4 g d'échantillon de fèces ou de la fraction solide de lisier après compression. La teneur des matières minérales et par différence la teneur des **matières volatiles en suspension ou MVS**, a été déterminée par combustion (12 heures à 550°C) (APHA *et al.*, 1985). Cette dernière analyse a été appliquée seulement aux lisiers de l'élevage de La Pomarède.

La teneur en **Demande Chimique en Oxygène (DCO) totale et soluble** s'effectue par l'oxydation totale de la matière organique par un excès de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) en milieu acide (H_2SO_4) et à chaud. L'excès d'oxydant est ensuite titré par une solution réductrice de sel de Mohr (sulfate de fer et d'ammonium $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, 0,25 N) (APHA *et al.*, 1985).

Le dosage du **carbone organique total** est réalisé à l'aide d'un analyseur DOHRMANN (DC 190) sur le principe d'une oxydation à haute température (combustion). Le dioxyde de carbone formé est détecté par un analyseur à infrarouge à double faisceau. L'échantillon doit être préalablement dilué pour obtenir une valeur comprise dans la gamme d'étalonnage. Un volume de 50µl d'échantillon est injecté avec une seringue. Une première injection permet de connaître le **carbone total** de la solution (**CT**). Une deuxième injection, lors de laquelle l'échantillon est décarbonaté par acidification (acide orthophosphorique à 10 %) et barbotage à l'oxygène en vue de libérer et déterminer le **carbone inorganique (CI)** sous forme de dioxyde de carbone. Le calcul du **carbone organique total (COT)** est alors donné par : $COT = CT - CI$.

Les **acides gras volatils** (AGV) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse sous un gradient de température piloté par un appareil CHROMPACK CP900 équipé d'un détecteur à ionisation de flammes. Les conditions opératoires sont : colonne de migration Econocap FFAP (Altech®) ; gradient de température du four de 90°C à 130°C ; température de l'injecteur 250°C, température du détecteur : 275 °C, pression du gaz vecteur (azote) : 335 kPa, pression d'hydrogène 150 kPa ; pression d'air : 150 kPa. Un volume de 0,2 µL d'un mélange (50/50 vol/vol) de l'échantillon et de l'étalon interne (acide éthyl-butyrique à 1 g/L) est injecté et les résultats obtenus sont traités par un logiciel informatique Chromcard.

Les teneurs en **azote organique** (protéines, peptides, acides aminés,...) et **ammoniacal totales et solubles** ont été déterminées selon la méthode Kjeldhal. La méthode d'analyse de l'azote total correspond à une minéralisation totale de l'échantillon à chaud et en milieu acide (H₂SO₄ + catalyseur Kjeldhal), transformant ainsi l'azote organique en ammoniac. Après alcalinisation par addition de soude⁹, l'ammonium est distillé avec un appareil Büchi 320, recueilli dans une solution acide et dosé par titration à l'acide chlorhydrique (0,1 N) (APHA *et al.*, 1985).

Le dosage des **ions (phosphate, sulfate, nitrite et nitrate)** a été effectué par chromatographie d'échange d'ions avec un appareil DIONEX DX-100. Les échantillons ont été préalablement dilués pour se placer dans la gamme d'étalonnage choisie, entre 5 et 10 mg/L. Ils furent injectés dans l'appareil par l'intermédiaire d'un passeur automatique AS40. La séparation des cations se fait grâce à une colonne CS12A (4 mm) précédée de deux pré-colonnes (NG1 puis CG12A). L'éluant utilisé est l'acide

⁹ La teneur en **Azote ammoniacal** est mesuré à partir de cette étape.

méthyl sulfonique à une concentration de 15,53 mM. Les anions sont séparés sur une colonne AS12A (4 mm) précédée de deux pré-colonnes (NG1 puis AG12A) en utilisant un mélange carbonate-bicarbonate de sodium (2,7 mM/0,3 mM). Les colonnes sont suivies d'une membrane de suppression des anions (CSRS I). La détection est réalisée à l'aide d'une cellule conductimétrique. Enfin les données sont intégrées par le logiciel PEAKNET 4.30.

Le dosage de **Sulfure dissous** dans la fraction totale a été effectué par la méthode de (Percheron *et al.*, 1996). La mesure de la concentration en **Phosphore total** correspond à une minéralisation en milieu sulfurique d'un mélange échantillon - acide nitro-perchlorique. L'acide phosphorique est alors transformé en acide phosphomolibdique qui est lui-même réduit par l'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique, la mesure s'effectuant par colorimétrie (à 660 nm) (Merzouki, 2001).

L'analyse de gaz (N_2) a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse par injection d'1 ml du biogaz produit. La séparation des différents gaz de fermentation est réalisée sur deux colonnes montées en série : le CO_2 est séparé sur une colonne Hayesep Q et l' O_2 , le H_2 , le N_2 et le CH_4 sont séparés sur un tamis moléculaire de 5 Å. Le gaz vecteur est de l'argon (300 kPa). La température du four est de 30°C et la température de l'injecteur est fixée à 100°C. La détection est effectuée à l'aide d'un catharomètre (principe du pont Wheaston) dont l'intensité est initialement fixée à 90mA. L'intégration des pics est réalisée à l'aide d'un intégrateur de type Shimadzu® GC8A. La calibration de l'appareil est préalablement réalisée avec un mélange de gaz contenant CO_2 , O_2 , H_2 , N_2 et CH_4 en concentrations connues, respectivement (en volume) 25 %, 2 %, 5 %, 10 % et 58 %.

RESULTATS : CHAPITRE 5

CHAPITRE 5

Caractérisation microbiologique et physico-chimique du lisier de porcs

5.1. Les objectifs et la stratégie

Les travaux présentés dans ce chapitre avaient pour objectifs de mieux connaître l'écosystème représenté par le lisier de porc et les interactions possibles entre ses composants biotiques et abiotiques. Ces travaux se décomposent en trois étapes :

- 1) Analyser les principaux paramètres physico-chimiques d'un lisier, et notamment les substances malodorantes.
- 2) Définir la structure de la communauté microbienne de ce lisier par des méthodes moléculaires.
- 3) Utiliser les connaissances acquises et les données bibliographiques pour reconstruire la chaîne trophique présente dans le lisier et comprendre son fonctionnement.

Le modèle choisi est celui d'un lisier de préfosse de bâtiment d'engraissement en fin de stockage (3 semaines en préfosse). Ce type de lisier est le plus important à la fois en terme de quantité produite et en terme de charge polluante. D'après la littérature, de nombreuses populations microbiennes peuvent être actives dans ce type d'écosystème où il existe une grande quantité de matière organique et de très fortes concentrations en certains métaux lourds et métabolites excrétés.

5.2. Résultats et discussion

5.2.1. Les conditions physico-chimiques

D'un point de vue environnemental, le lisier apparaît comme un écosystème anaérobie mésophile avec un pH proche de la neutralité (**Tableau 5.1**). Ces conditions sont à priori favorables à la digestion anaérobie et à la méthanogénèse (Zehnder et Stumm, 1988 ; Grady *et al.*, 1999).

Tableau 5.1. Mesures *in situ* dans la préfosse d'engraissement.

Potentiel redox	-355 ±10 mV
Température	19,8 ± 0,1 °C
pH	6,85 ± 0,05

Les résultats des analyses physico-chimiques sont présentés dans le **Tableau 5.2**. Les concentrations de plusieurs composés comme les MS, MES, DCO, AGV, NTK, l'azote ammoniacal et l'H₂S sont très similaires à celles trouvées par d'autres auteurs (Campbell *et al.*, 1997 ; Levasseur, 1998 ; Coillard, 1999 ; Wu *et al.*, 1999 ; Levasseur et Texier, 2001 ; Béline, 2001a) :

- Le lisier contient des quantités voisines de matières sèches et de matières en suspension (MES) autour de 120 g/L. La quantité de matières volatiles en suspension (MVS) représente environ 80 % des MES. Cette forte concentration en MVS révèle une grande quantité de matière organique qui est confirmée par la valeur de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) sur la fraction totale du lisier.
- La différence entre les DCO totale et soluble montre que la matière organique contenue dans le lisier est essentiellement particulaire (probablement des fibres). La faible différence observée entre la DCO soluble (32 g O₂/L) et le carbone organique total (COT) autour de 28 g O₂/L montre en revanche que la matière organique soluble est facilement assimilable.
- Trois composés impliqués dans les émissions d'odeurs sont présents en forte concentration (Hamano *et al.*, 1972 ; Ohta et Ikeda, 1978 ; Bourque *et al.*, 1987) :
 - La concentration totale en acides gras volatiles (AGV) est de 16 ± 0,4 g/L avec 58 % d'acétate. Cette concentration élevée en AGV est une constante dans les lisiers en général (Bernard et Hédout, 1979 ; Spoelstra, 1979). En plus des problèmes d'odeurs, elle peut perturber le bon déroulement de la digestion anaérobie. En effet, dans les procédés de digestion anaérobie en fonctionnement, l'acétate s'accumule rarement à des concentrations supérieures à 0,06 à 0,6 g/L.

Tableau 5.2. Analyses physico-chimiques des fractions totale et soluble du lisier.

Paramètre (g/L sauf MS)	Fraction soluble	Fraction totale
Matières sèches (g/Kg) (MS)	n.a.	122 ± 15
Matières en suspension (MES)	n.a.	128,1 ± 5
Matières volatiles en suspension (MVS)	n.a.	101
Demande Chimique en Oxygène (g O₂/L) (DCO)	32 ± 0,1	115 ± 7,4
Azote Total Kjeldahl (NTK)	4,3 ± 0,5	9,4 ± 0,9
Azote Ammoniacal	3,8 ± 0,6	7,1 ± 0,7
Sulfure d'hydrogène	n.a.	0,326 ± 0,01
Phosphore total	n.a.	3,93 ± 0,08
Carbone Total (CT)	10,9 ± 0,01	n.a.
Carbone Organique Total ^a (COT)	10,5 ± 0,1	n.a.
Carbone Inorganique (CI)	0,5 ± 0,1	n.a.
Acides gras volatils :	16 ± 0,4	n.a.
Acétate	9,2 ± 0,2	
Propionate	2,8 ± 0,1	
Butyrate	2,6 ± 0,01	
Isobutyrate	0,7 ± 0,06	
Isovalérate	0,7 ± 0,02	
Anions :		n.a.
Nitrite	0,05 ± 0,002	
Nitrate	0	
Phosphate	0,103 ± 0,024	
Sulfate	0	

n.a. = L'analyse ne s'applique pas.

a = La concentration du COT est équivalente à 28 g O₂/L (unité de DCO).

- La concentration en azote ammoniacal est aussi très élevée. Elle correspond à 75 % et 88 % de l'azote total (NTK) des fractions totale et soluble, respectivement.
- La concentration en sulfure d'hydrogène est relativement forte (0,326 ± 0,01 g/L).

Ces substances sont reconnues pour avoir un effet inhibiteur sur certains groupes microbiens et par conséquent sur le processus de digestion anaérobie (Koster et Koomen, 1988b ; Aguilar *et al.*, 1995 ; Speece, 1996).

- La concentration en azote organique soluble (NTK – N-ammoniacal solubles) est de 0,5 g/L, soit 12 % de l'azote soluble total qui probablement correspond aux

protéines et aux fibres végétales non digérées par les porcs. Ces sont les principaux substrats pour la production des AGV dans le lisier (Cooper et Cornforth, 1978 ; Spoelstra, 1979).

- La concentration en phosphore observée (3,88 g/Kg MS) est trois fois plus élevée que celle habituellement trouvée dans le lisier (1,3 g/Kg MS) (Belli-Filho et Martin, 1996). Les fortes concentrations en phosphore et azote peuvent affecter le rapport carbone : azote : phosphore (C : N : P) nécessaire au bon fonctionnement des procédés biologiques de dépollution, notamment lors de la nitrification-dénitrification ou de la déphosphatation (Henze et Harremoës, 1983 ; Bernet, 2004). Par exemple, les procédés anaérobies requièrent un rapport C : N : P de 100 : 5 : 1 tandis que le lisier possède un rapport 115 : 9 : 4 dû à l'excès d'azote et de phosphore principalement. Aucune séquence de l'inventaire du lisier n'a été proche de séquences des micro-organismes connues pour réaliser la déphosphatation en anaérobiose.
- La faible quantité de nitrite détectée ($0,05 \pm 0,002$ g/L) pourrait être l'évidence d'une faible activité nitrifiante.

5.2.2. Inventaire moléculaire de la communauté microbienne du lisier

Un inventaire moléculaire de la communauté microbienne *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* présente dans le lisier a été réalisé par amplification, clonage, séquençage et analyse phylogénétique des gènes ribosomiques (ADNr) 16S pour les procaryotes et 18S pour les eucaryotes. L'inventaire bactérien a été produit à partir de trois banques (PIMALC, PIMALD et PIMALE) et le séquençage a été réalisé sans tri préalable des clones. Les inventaires *Archaea* et *Eucarya* ont été produits à partir des banques PIMADF et PIMAEC respectivement. Dans les deux cas, un tri des clones a été effectué par RFLP avant leur séquençage. L'analyse par RFLP des clones *Archaea* et *Eucarya* a montré 8 et 5 profils différents, respectivement. Le même nombre de phylotypes a été trouvé pour ces deux domaines après séquençage et analyse phylogénétique. Pour tous les domaines, les séquences présentant moins de 3 % de divergence ont été regroupées comme appartenant à un même phylotype¹ (**voir Annexes : Tableau a5.1**).

Un total de 206 clones *Bacteria*, 45 clones *Archaea* et 34 clones *Eucarya* a été séquencé sur une longueur d'environ 500 paires de bases (pb) pour les procaryotes et

¹ La divergence au sein de chaque phylotype a été établie à partir de la matrice de distances calculée à l'aide du logiciel ARB (voir Annexe 1, Tableau 5.2).

900 pb pour les eucaryotes. L'analyse phylogénétique a regroupé les séquences en 108 phylotypes *Bacteria* distribués parmi au moins huit *phyla*, 8 phylotypes *Archaea* et 5 phylotypes *Eucarya* (Tableau 5.3).

Tableau 5.3. Affiliation phylogénétique des séquences *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* trouvées dans l'inventaire moléculaire du lisier.

Groupe Phylogénétique ^a	Phylotypes	Nombre de clones	Similarité moyenne (%) ^b
BACTERIA			
Bactéries Gram positives à Bas GC %			
<i>Eubacterium</i> et apparentées	29	55	92.7
<i>Clostridium</i> et apparentées	21	31	93.7
Subdivision <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>	12	41	96.1
<i>Mycoplasma</i> et apparentées	16	20	90.8
<i>Sporomusa</i> et apparentées	2	2	98
Groupe <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i>	19	41	91.8
Spirochetes et apparentées	3	5	89.6
Proteobacteria	4	5	94
Minor <i>Phyla</i> ^c			
Groupe <i>Fibrobacter/Acidobacterium</i>	1	1	n.a.
Assemblage <i>Flexistipes sinuarabici</i>	1	1	n.a.
TOTAL	108	202	
ARCHAEA			
<i>Euryarchaeota</i>			
CA11 et apparentées	3	31	98.3
<i>Methanobacteriales</i>	2	9	96
<i>Methanomicrobiales</i>	3	4	96.3
TOTAL	8	44	
EUCARYA			
<i>Blastocystis</i> ^c	1	2	n.a.
<i>Alveolata</i>	2	3	92
<i>Entamoebidae</i> ^c	1	1	n.a.
<i>Nematoda / Rhabditida</i> ^c	1	27	n.a.
TOTAL			

a. Le groupe phylogénétique correspond au Ribosomal Data Base Project II (RDP-II).

b. La similarité moyenne correspond à la moyenne des valeurs de similarité obtenues pour chaque phylotype par rapport à la séquence la plus proche trouvée dans les bases de données.

c. La similarité moyenne n'a pas été calculée car il n'y a qu'un seul phylotype.

n.a. = non applicable.

Cette analyse a montré une très grande diversité de bactéries contre une faible diversité d'*Archaea* et d'*Eucarya*. Tous les phylotypes analysés ont pu être affiliés à des phyla bien définis sauf le phylotype PIMALE95 qui était à la frontière des *Flexibacter-Cytophaga- Bacteroides*. Enfin, quatre séquences de *Bacteria*, une d'*Archaea* et une d'*Eucarya* se sont révélées être des chimères, elles ont été exclues de l'analyse.

5.2.2.1. Courbes de raréfaction

La représentativité du nombre de séquences effectuées pour les trois banques a été estimée :

- Par le calcul selon la formule de (Good, 1953) : $R = [1-(n/N)] (100)$; R = représentativité, n = nombre d'espèces uniques, N = nombre total de clones analysés.
- Par le traçage des courbes de raréfaction pour les trois domaines. Ces courbes sont obtenues en traçant le nombre de phylotypes observés en fonction du nombre de séquences analysées (**Figure 5.1**). Pour une diversité infinie, chaque nouvelle séquence analysée correspond à une nouvelle espèce et l'on obtient la diagonale du graphique (ligne rose continue, **Figure 5.1**). Au fur et à mesure que les nouvelles séquences analysées correspondent à des espèces déjà obtenues, la courbe s'infléchit pour finir par un plateau lorsque toutes les espèces de l'échantillon ont été décrites (ligne rose pointillée).

Pour le domaine *Bacteria*, la représentativité de notre analyse est seulement de 46 % car plus de 50 % des phylotypes obtenus contiennent un seul clone. Cette grande diversité bactérienne correspond aux résultats observés avec la technique de SSCP. Elle est à mettre en parallèle avec la très grande diversité phylogénétique de la communauté bactérienne intestinale du porc observée par (Leser *et al.*, 2002) : l'analyse de 4 270 séquences du tube digestif de porcs a révélé 375 phylotypes pour une représentativité de 97 %. Au contraire, les analyses des domaines *Archaea* et *Eucarya* montrent une diversité beaucoup plus faible avec une représentativité de 81% et 87%, respectivement. Cette faible diversité est en accord avec les analyses RFLP effectuées lors du tri des clones où le classement des séquences par RFLP correspond au nombre de phylotypes observés.

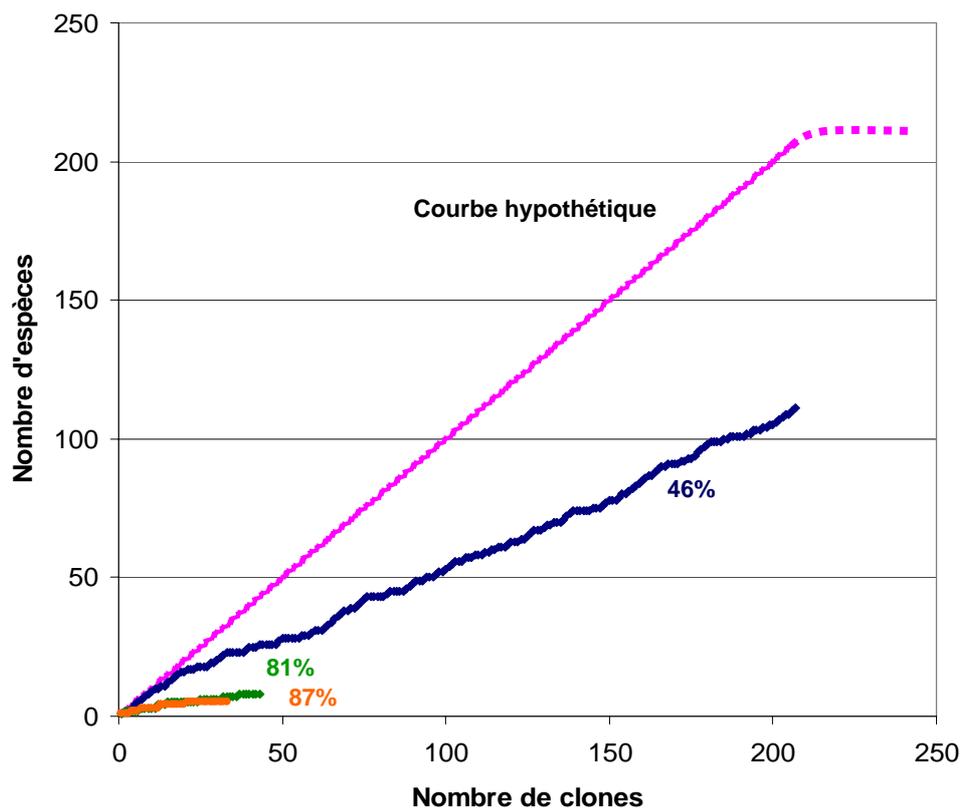


Figure 5.1. Courbes de raréfaction des inventaires *Bacteria* (bleue), *Archaea* (orange) et *Eucarya* (verte). La ligne rose montre une courbe hypothétique. Les pourcentages indiquent la représentativité de l'échantillon estimée selon la formule de (Good, 1953).

5.2.2.2. Diversité et abondance bactérienne

L'inventaire moléculaire du domaine *Bacteria* a été fait à partir de trois clonages indépendants nommés PIMALC (38 séquences analysées), PIMALD (62 séquences) et PIMALE (102 séquences) qui ont eu un pourcentage d'efficacité de clonage de 70, 85 et 100 %, respectivement. L'analyse moléculaire des 202 séquences d'ADNr 16S effectuées a produit 108 phylotypes différents.

La majorité des séquences analysées sont phylogénétiquement éloignées des séquences présentes dans les bases de données. Sur les 108 phylotypes observés, seulement 39 (36 %) présentent une similarité de séquence de 97 % ou plus avec des séquences connues, 44 (41 %) montrent une similarité entre 97-90 %, les autres (23 %) ont des valeurs de similarité entre 90 et 80 % (voir Annexes : Tableau a5.1).

Seulement 13 % des phylotypes totaux ont été identifiés comme des espèces connues et cultivées (**Tableau 5.2**). Tous, sauf deux, appartiennent aux bactéries Gram positives à bas GC %. Ce groupe phylogénétique contient 74 % des phylotypes observés et 74 % des séquences *Bacteria* analysées. Les autres phylotypes appartiennent au groupe *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (20 % des séquences *Bacteria*), aux Spirochètes et apparentés (2,5 %), aux Proteobacteria (2,5 %), au groupe *Fibrobacter* (0,5 %) et à l'assemblage *Flexistipes sinusarabici* (0,5 %) (**voir Annexes : Figure a5.2**). Tous les phylotypes du groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* ont des similitudes de séquence faibles à modérées avec des séquences de souches cultivées.

Les quatre phylotypes les plus représentés appartiennent à la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* et contiennent 12 % des séquences bactériennes totales. Ils sont proches de : *Lactobacillus reuteri* (X76328)² pour le phylotype PIMALD40 contenant 9 % des séquences *Bacteria* ; une séquence isolée de lisier de porc et faiblement liée à *Bacteroides forsythus* pour PIMALD54 (6 % des séquences) ; *Streptococcus alactolyticus* pour PIMALC07 (5 % des séquences) et *Clostridium phytofermentans* pour PIMALC197 (5 % of séquences). Trente et un phylotypes (29 %) comptaient entre 4 et 2 séquences et 73 phylotypes (68 %) comptaient seulement une séquence.

Nous avons constaté à posteriori que la banque *Bacteria* a peut-être été biaisée par rapport au groupe *Bifidobacterium* car une des amorces universelles de PCR utilisée pour le clonage présente 4 mésappariements pour ce groupe bactérien. Cependant, ce groupe apparaissait minoritaire (<1%) en abondance et diversité dans l'inventaire moléculaire de 4 200 séquences du tractus digestif de porc réalisé par (Leser *et al.*, 2002).

5.2.2.2.1. *Eubacterium* et apparentés (RDP registration [reg.] no. 2.30.4)

Tel qu'il est défini dans la RDP, ce groupe phylogénétique contient plusieurs sous-groupes : le groupe *Eubacterium* et les groupes *Clostridium coccoïdes*, *C. propionicum*, *C. lentocelum* et *C. lituseburense*. Les micro-organismes cultivés de ce groupe présentent des caractéristiques physiologiques diverses mais ils sont tous anaérobies avec un catabolisme fermentaire important. Ils fermentent les carbohydrates et certains

² Numéro d'accèsion dans les banques de données.

sont saccharolytiques ou même protéolytiques. Ils produisent des mélanges d'acides organiques essentiellement le formate, l'acétate et le butyrate.

Dans l'inventaire, c'est le groupe le plus abondant avec 22 % des séquences bactériennes et le plus divers avec 21 phylotypes. L'identification des séquences est globalement correcte avec une similarité moyenne entre les phylotypes de ce groupe et les séquences les plus proches présentes dans les bases de données de 92,7 % et un pourcentage de bootstrap supérieur à 50 % pour tous les phylotypes, excepté pour les phylotypes PIMALE44, PIMALE109 et les quatre phylotypes proches de *Clostridium phytofermentans* (Fig. 5.2a et b).

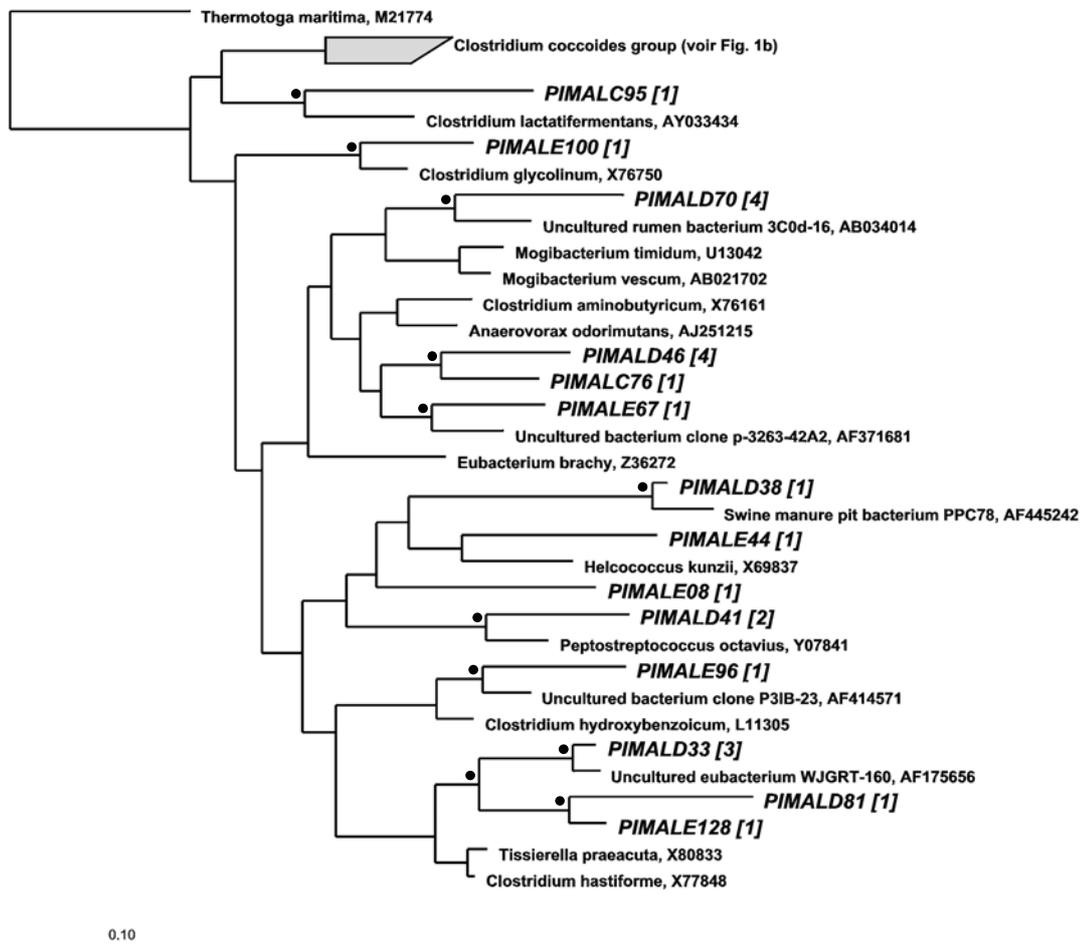


Figure 5.2 (a). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Eubacterium* et apparentées (RDP Reg. No 2.30.4). Le nombre de clones pour chaque phylotype est indiqué entre parenthèses. L'arbre consensus a été calculé par la méthode des distances en utilisant les algorithmes de neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987) et la correction de (Jukes et Cantor, 1969). Le point noir sur les nœuds des branches indique un pourcentage de bootstrap supérieur à 50 %.

Seulement cinq phylotypes de ce groupe ont une similitude de séquence supérieure à 97 % avec des séquences connues des bases de données. Deux d'entre eux, PIMALC10 et PIMALE27, ont été identifiés comme *Roseburia cecicola* isolée de l'intestin de porc et *Ruminococcus obeum* isolée de fèces humains, respectivement (Fig. 5.2b).

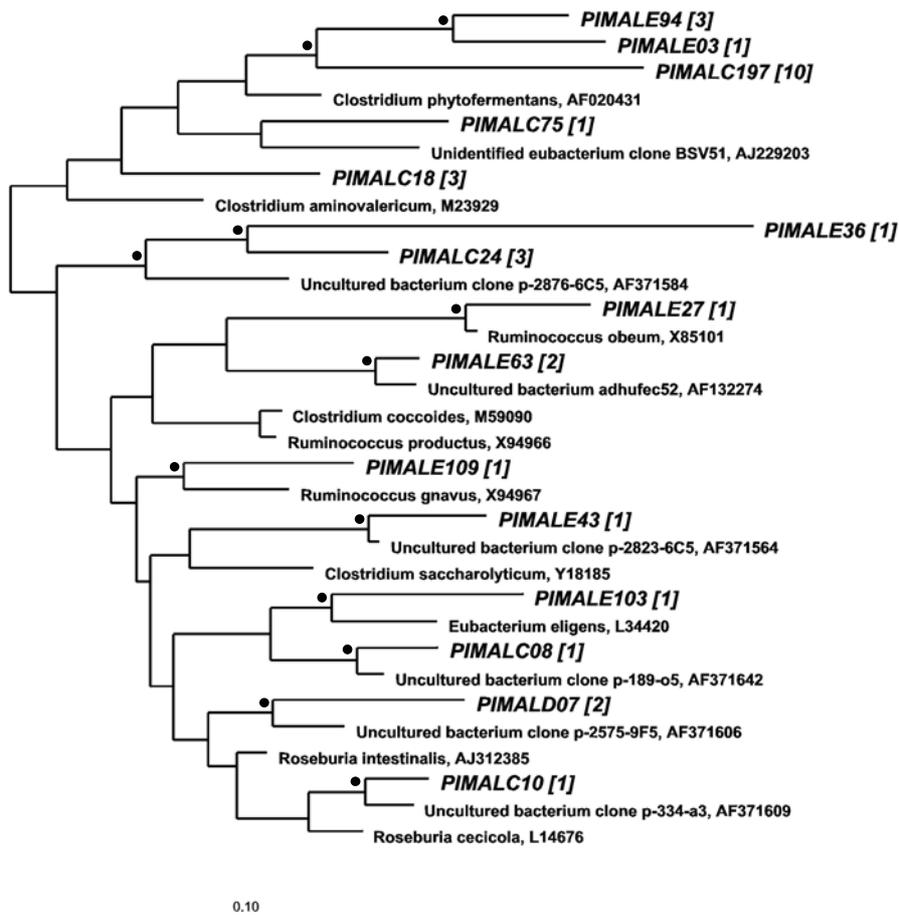


Figure 5.2 (b). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Clostridium coccooides* (RDP Reg. No 2.30.4). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.4 (a).

La majorité des phylotypes *Eubacterium* et apparentés (15 sur 21) appartient au sous-groupe *Clostridium coccooides* (RDP registration [reg.] no. 2.30.4.1). Le phylotype numériquement dominant PIMALC197, est seulement faiblement lié à la bactérie *Clostridium phytofermentans* isolée d'un sol forestier et se groupe avec quatre autres phylotypes (PIMALC18, PIMALE03, PIMALE94, et PIMALC75) (88 % de similarité

dans le groupe mais une faible valeur de bootstrap de 40 %). Tous ensemble ces phylotypes contiennent 9 % des séquences bactériennes analysées. Ils ne sont pas présents dans l'inventaire du tractus intestinal de porc (Leser *et al.*, 2002).

Dans le groupe des *Eubacterium* et apparentés, six phylotypes du lisier sont proches de phylotypes du tube digestif porcin et deux sont liés à des espèces isolées de l'intestin de porc. Tous les autres phylotypes sont liés à des séquences ou des micro-organismes isolés de fèces de porc ou humain. Les six autres phylotypes du groupe *Eubacterium* et apparentés appartiennent aux sous-groupes *Eubacterium*, *C. lituseburense* ou *C. propionicum* (**voir Annexes : Tableau a5.1**).

5.2.2.2.2. *Clostridium* et apparentés (RDP reg. no. 2.30.9)

Un total de 29 phylotypes ont été affiliés aux **groupes *Clostridium***. Huit d'entre eux appartiennent au groupe *C. purinolyticum* (RDP reg. no. 2.30.5) et contiennent environ 5,5 % des séquences *Bacteria* analysées. Ils ne sont fortement liés avec aucune séquence connue excepté pour les phylotypes PIMALD33 et PIMALD38 qui présentent plus de 98 % de similarité avec des séquences obtenues d'une aquifère contaminée par un élevage et d'une fosse à lisier de porcs, respectivement (**voir Annexes : Tableau a5.1**). Ce groupe est largement sur-représenté en comparaison des résultats observés sur le tractus digestif porcin (Leser *et al.*, 2002).

Les 21 autres phylotypes *Clostridium* (15 % des séquences *Bacteria*) se répartissent entre les sous-groupes *C. botulinum* (RDP reg. no. 2.30.9.2) et *C. leptum* (RDP reg. no. 2.30.9.1) (**Fig. 5.3a et b**). L'observation la plus frappante est la forte similarité entre 10 des 13 phylotypes du sous-groupe *C. leptum* (RDP reg. no. 2.30.9.1) avec des phylotypes isolés du tractus gastro-intestinal de porcs publiés par (Leser *et al.*, 2002). Trois d'entre eux (PIMALD55, PIMALE12 et PIMALE28) groupent autour d'*Eubacterium desmolans* isolé de fèces de chat (85 % de similarité dans le groupe et une valeur de bootstrap de 60 %) et deux autres (PIMALE64 et PIMALE91) groupent autour de *Fusobacterium prausnitzii* isolé de fèces animaux (90 % similarité dans le groupe et 73 % de valeur de bootstrap). Les trois derniers phylotypes de ce sous-groupe, qui ne sont pas liés aux séquences de tractus intestinal de porc, se sont placés proche de *Clostridium viride* isolé de l'intestin humain (PIMALE114), ou de micro-organismes non cultivés du rumen (PIMALE18) ou d'un digesteur anaérobie traitant les eaux usées d'une brasserie (PIMALE118).

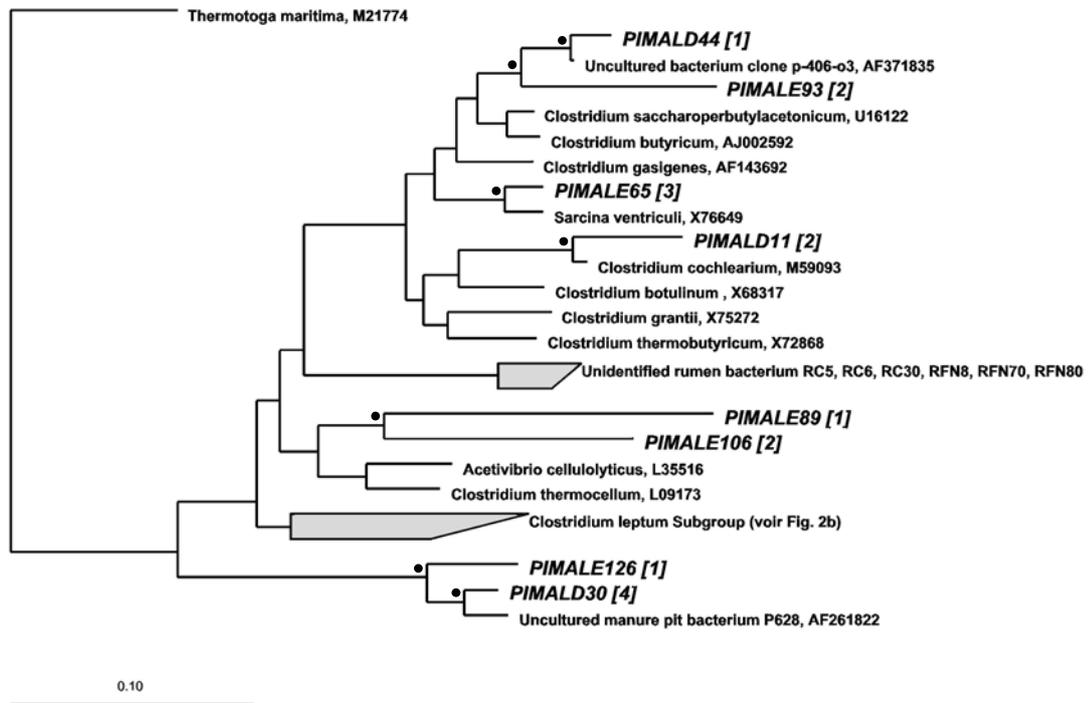


Figure 5.3 (a). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Clostridium* et apparentées (RDP Reg. No 2.30.9). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

Dans le sous-groupe *C. botulinum*, les phylotypes PIMALE65 et PIMALD11 ont été identifiés comme *Sarcina ventriculi* et *C. cochlearium* isolés d'estomac de cochon d'Inde et de fèces humain respectivement. Les phylotypes PIMALD30 et PIMALE126 groupent avec des séquences de micro-organismes non cultivés récupérées de fosses de stockage de lisier de porcs (95 % similarité dans le groupe, valeur de bootstrap de 96 %). À l'exception du phylotype PIMALE89, tous les autres sont liés à des séquences qui viennent d'écosystèmes méthanogènes de digestion anaérobie comme le tractus intestinal d'animaux mono-gastrique, le rumen ou les procédés anaérobies de traitement de la pollution (**voir annexes : Tableau 5.3**).

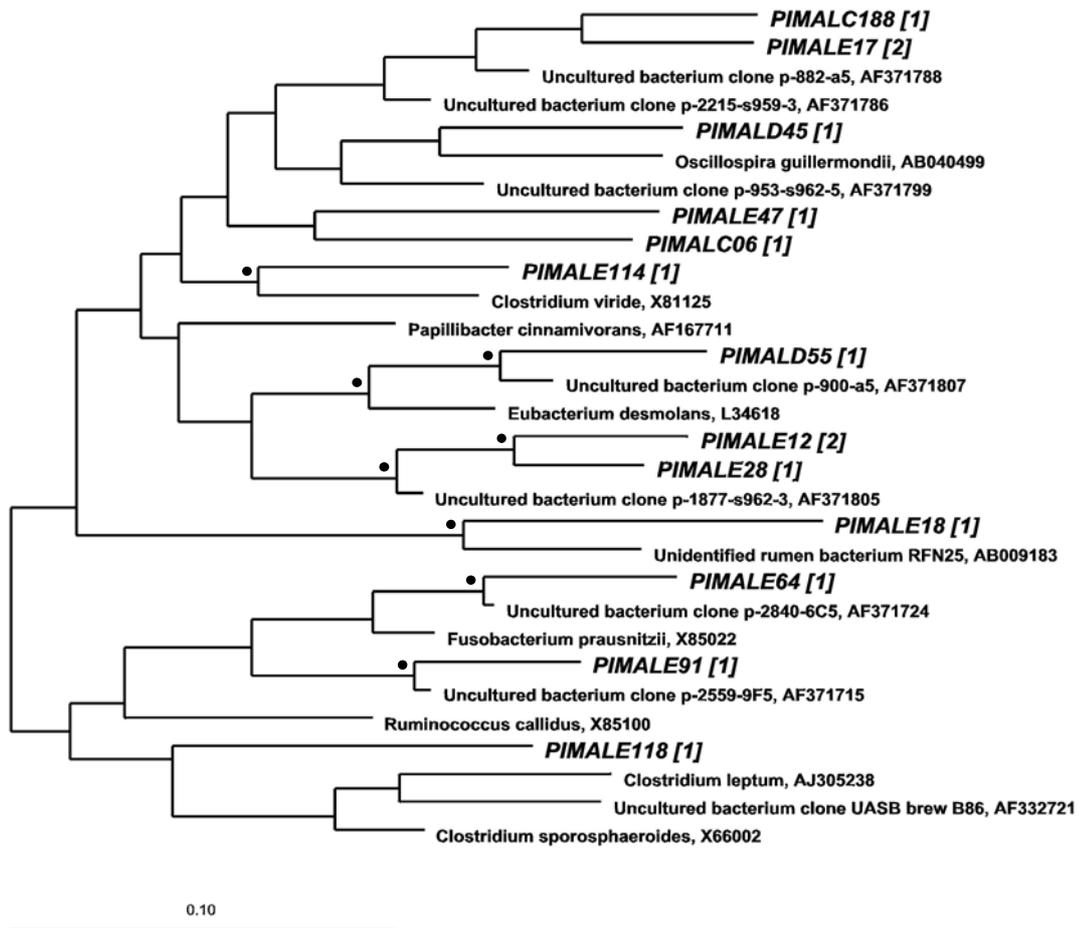


Figure 5.3 (b). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au sous groupe *Clostridium leptum* (RDP Reg. No 2.30.9). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

5.2.2.2.3. Groupe *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (RDP reg. no. 2.30.7)

Les 12 phylotypes affiliés à ce groupe ont une similarité moyenne de 96,1 % et des valeurs de bootstrap supérieures à 50 % pour toutes les séquences. C'est le score le plus élevé observé parmi tous les groupes analysés. Ce groupe détient aussi le record de similitude avec des micro-organismes cultivés puisque cinq phylotypes sont proches à plus de 97 % de micro-organismes cultivés (**Fig. 5.4**).

Malgré une diversité plus faible que pour les groupes précédents, ce groupe représente 20 % des clones bactériens car il contient deux des phylotypes les plus nombreux de l'inventaire (PIMALD40 et PIMALC07).

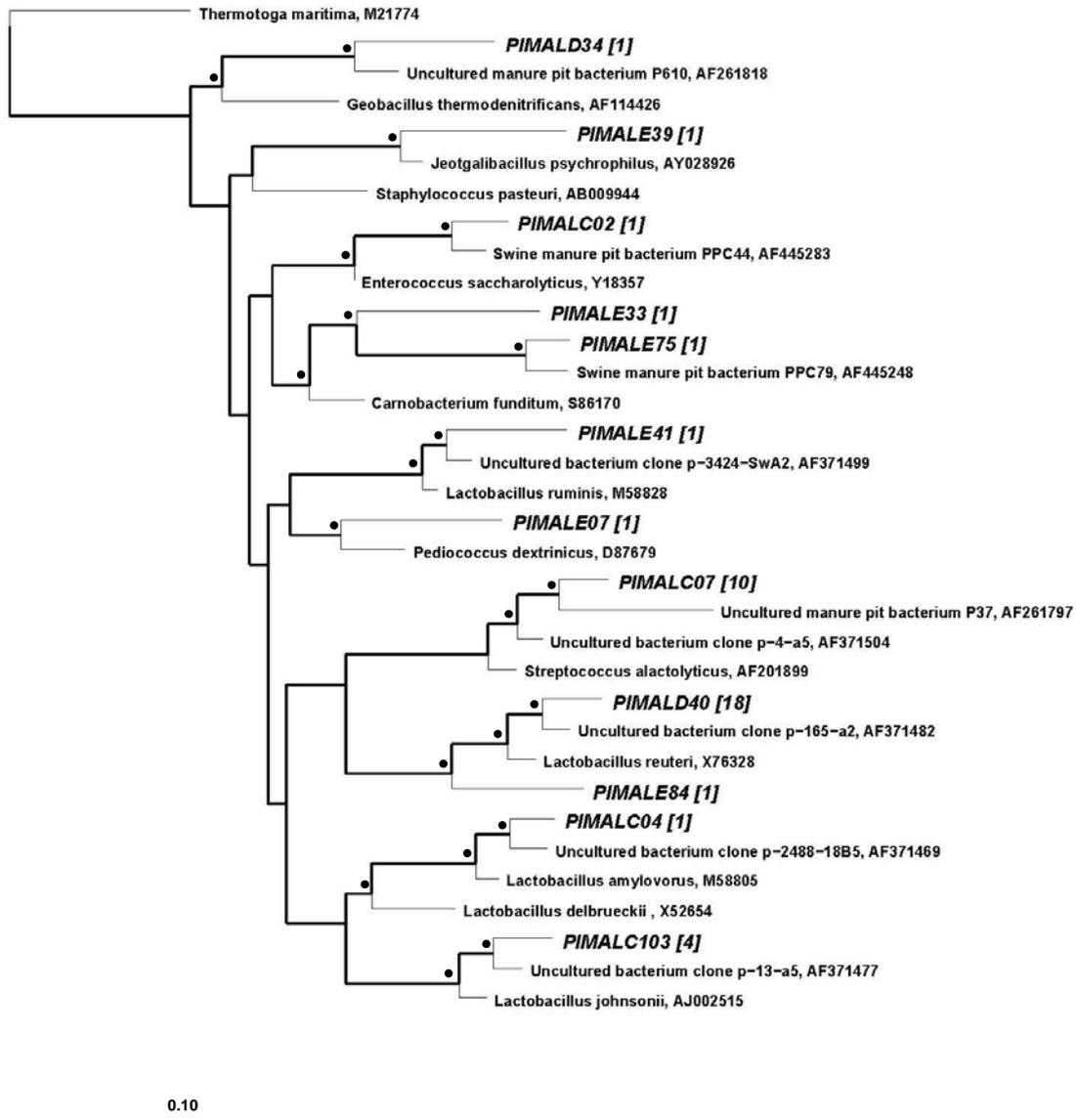


Figure 5.4. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées à la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (RDP Reg. No 2.30.7). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

Dans le groupe *Lactobacilli*³, le phylotype PIMALD40 identifié comme *Lactobacillus reuteri* contient 18 séquences et représente 9 % des séquences *Bacteria*. Les autres phylotypes, proches d'espèces cultivées mais moins abondants, sont PIMALC103 (*L. johnsonii*), PIMALC04 (*L. amylovorus*) et PIMALE41 (*L. ruminis*). Le grand nombre de séquences appartenant au genre *Lactobacillus* trouvées dans le lisier est en accord avec leur dominance et leur stabilité dans le tractus digestif du porc et les excréments

³ RDP reg. no. 2.30.7.17.

(Fuller *et al.*, 1978 ; Henriksson *et al.*, 1995 ; Pryde *et al.*, 1999 ; Reid, 1999 ; Leser *et al.*, 2002).

Le second phylotype le plus nombreux de ce groupe a été identifié comme *Streptococcus alactolyticus* (PIMALC07 : 10 séquences, 5 % des séquences *Bacteria*). C'est le seul phylotype affilié aux Streptococci⁴. C'est le phylotype que nous avons choisi comme indicateur de contamination fécale de porcs pour le développement d'un système de détection par PCR en temps réel. En effet, ce phylotype est dominant dans cet inventaire et dans celui du tract intestinal de porc (Leser *et al.*, 2002), et il est aussi présent dans le fumier de porcs (**voir Chapitres 6 et 7**).

5.2.2.2.4. *Mycoplasma* et apparentés (RDP reg. no. 2.30.8)

Seize phylotypes (10 % des séquences bactériennes) ont été affiliés à ce groupe phylogénétique avec un bootstrap supérieur à 50 % à l'exception des phylotypes liés à *Acholeplasma palmae* (PIMALE37, PIMALE77 et PIMALE79) et *A. axanthum* (PIMALE32 et PIMALE68). Tous les phylotypes de ce groupe sont affiliés au sous-groupe *Acholeplasma-Anaeroplasma*⁵ sauf un, PIMALE69 qui appartient au sous-groupe *Spiroplasma* (**Fig. 5.5**).

Dans le sous-groupe *Acholeplasma-Anaeroplasma*, seulement cinq phylotypes présentent une similarité supérieure à 97 % avec des séquences déjà connues. Trois d'entre eux (PIMALD48, PIMALD39 et PIMALE40) sont proches de séquences originaires du tractus digestif porcin tandis que PIMALE35 et PIMALD69 sont proches d'*Eubacterium bifforme* et de *Catenibacterium mitsuokai* respectivement, deux espèces isolées de fèces humaines. Les autres phylotypes sont tous faiblement liés aux espèces cultivées *Mycoplasma feliminutum*, *Acholeplasma palmae*, *A. axanthum* et *A. laidlawii* mais avec une similarité moyenne très basse (87.6 %).

Ce groupe phylogénétique est apparu très divers et sur-représenté dans le lisier (10 % des séquences) comparé au tube digestif porcin (3 % des séquences). De plus la majorité des phylotypes du lisier est liée à des espèces connues du sous-groupe

⁴ RDP reg. no. 2.30.7.21.

⁵ RDP Reg. No 2.30.8.2.

Acholeplasma-Anaeroplasma alors que dans le tube digestif ils appartiennent en majorité au sous-groupe *Eubacterium cylindroides*⁶.

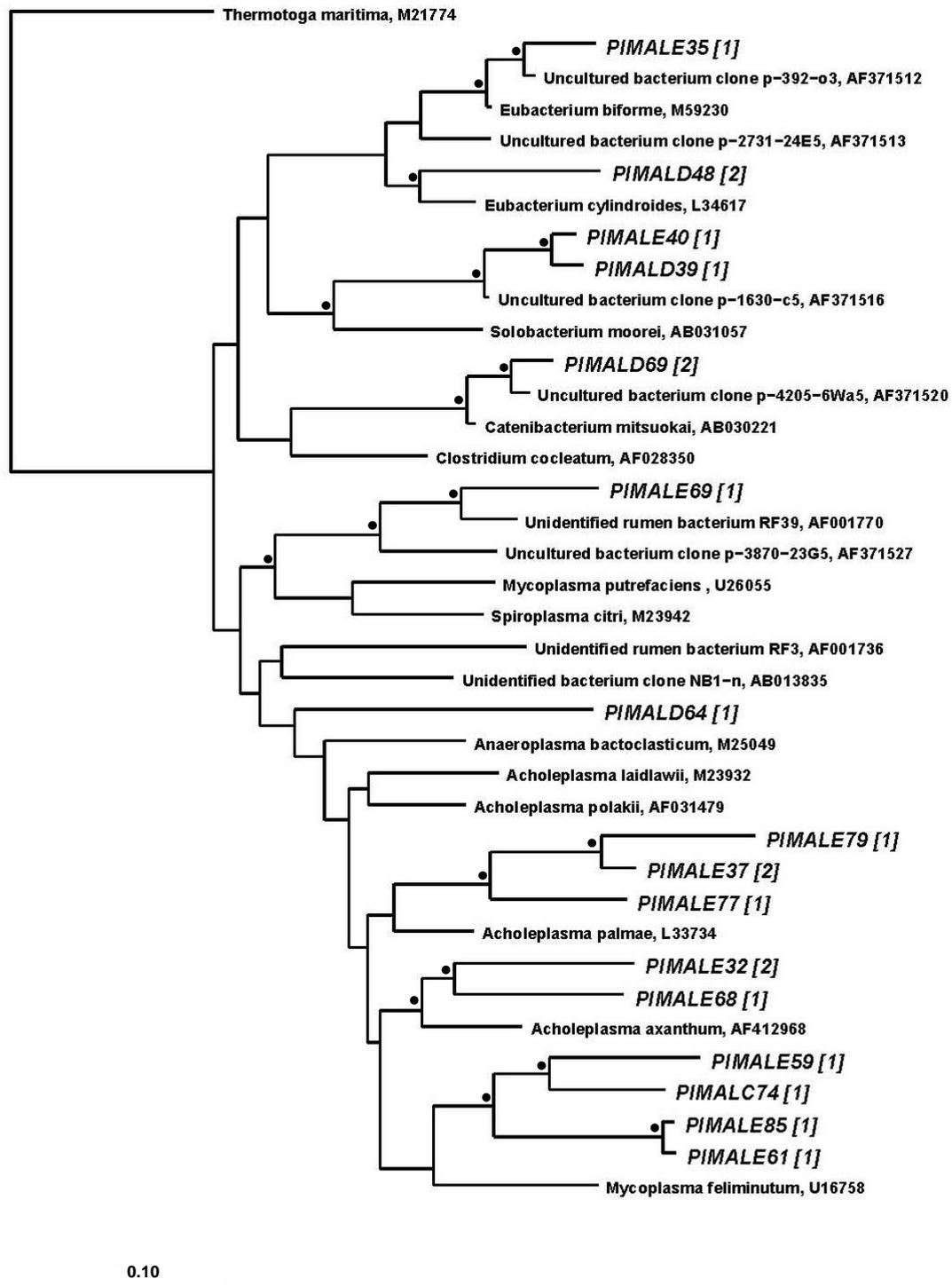


Figure 5.5. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Mycoplasmas* et apparentées (RDP Reg. No 2.30.8). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

⁶ RDP Reg. No 2.30.8.2.9.

5.2.2.2.5. *Sporomusa* et apparentés (RDP reg. no. 2.30.3)

Seulement deux phylotypes (1 % des séquences bactériennes) ont été affiliés à ce groupe avec une similarité moyenne de 98 % (**Fig. 5.6**). Ils sont liés à *Acidaminococcus fermentans* isolée de l'intestin porcin (PIMALE121) et à une séquence originaire du tractus digestif porcin (PIMALE16) avec un bootstrap de 73 % et de 97 %, respectivement.

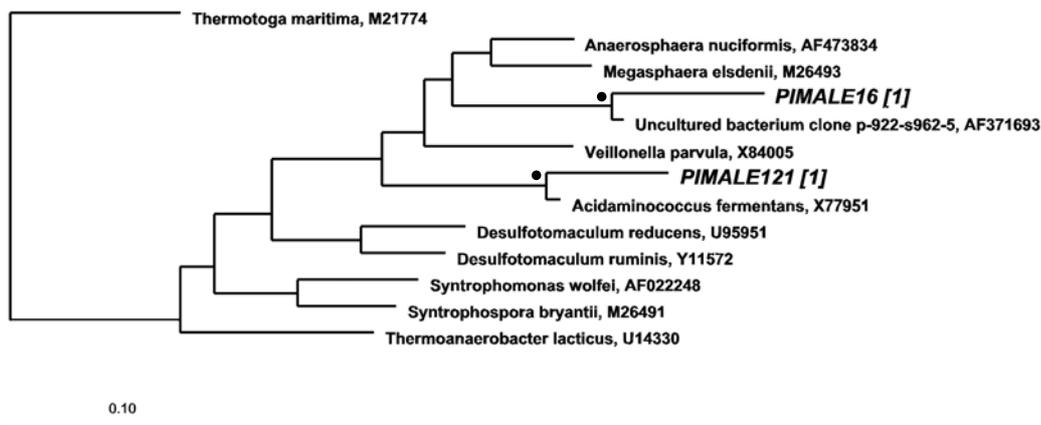


Figure 5.6. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliés au *Sporomusa* et apparentées (RDP reg. no. 2.30.3). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

5.2.2.2.6. Groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* (RDP reg. no. 2.15)

Dix-neuf phylotypes (20 % des clones bactériens) ont été affiliés au groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* (FCB) avec une similarité moyenne de 91,8 % et un bootstrap supérieur à 50 % (**Fig. 5.6**). La plupart d'entre eux (15 phylotypes) appartiennent au groupe *Bacteroides* (RDP reg. no. 2.15.1.2) et ont pour plus proche relatif des séquences récupérées de fèces de porcs ou de fosses de stockage de lisier.

Ils se répartissent dans les sous-groupes *Bacteroides fragilis*, *B. splanchnicus*, *Porphyromonas macacae* et *Prevotella nigrescens*. Seulement un phylotype a été identifié comme une espèce cultivée, la séquence PIMALC82 a 99 % de similarité avec la séquence de *Bacteroides* sp.139 isolé d'une fosse de stockage de lisier. Le second phylotype numériquement plus abondant de l'inventaire (PIMALD54, 12 séquences) groupe avec le phylotype PIMALC193 (2 séquences) et une séquence isolée d'un micro-organisme non cultivé de lisier de porcs dans le sous-groupe *P. macacae* (90 %

de similarité dans le groupe et 97 % de valeur de bootstrap). Seulement cinq phylotypes ont plus de 97 % de similarité avec des séquences déjà connues. Trois d'entre eux sont proches de séquences originaires de lisier de porc (PIMALE98, PIMALC193 et PIMALC82). Les deux autres (PIMALE45 et PIMALE05) sont apparentées à un clone du tube digestif porcin du groupe *Prevotella*.

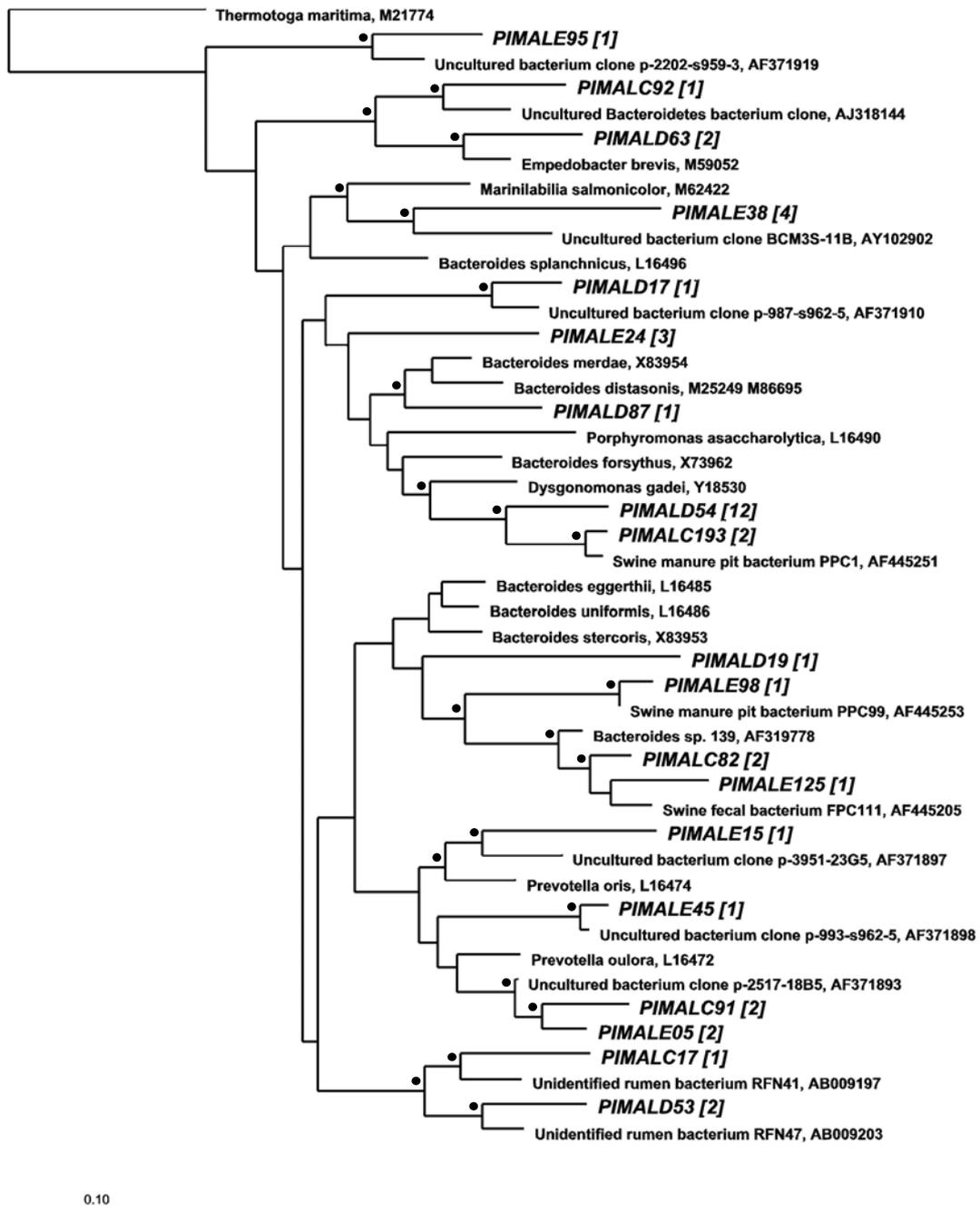


Figure 5.7. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* et apparentées (RDP reg. no. 2.15). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

Finalement, quatre phylotypes ont été classés en dehors du groupe *Bacteroides*. Le phylotype PIMALE38 est affilié au sous-groupe *Bacteroides splanchnicus*⁷. Il est apparenté au clone BCM3S-11B isolé des sédiments d'une rivière. Deux phylotypes sont modérément apparentés (autour de 90 % de similarité) à des séquences de *Flavobacterium* (PIMALD63 et PIMALC92). Le dernier phylotype, PIMALE95, n'a pu être assigné précisément à aucun sous-groupe. Il est apparenté à une séquence de micro-organisme de tractus digestif de porcs avec une valeur de bootstrap de 94 %.

5.2.2.2.7. Spirochètes et apparentés (RDP Reg. No 2.27).

Trois phylotypes ont été affiliés à ce groupe phylogénétique avec des valeurs de bootstrap supérieures à 94 % mais avec une similarité moyenne de 89,6 %. Aucun d'eux n'est proche de séquences d'écosystèmes intestinaux ou de fosses de stockage de lisier (**Fig. 5.8**).

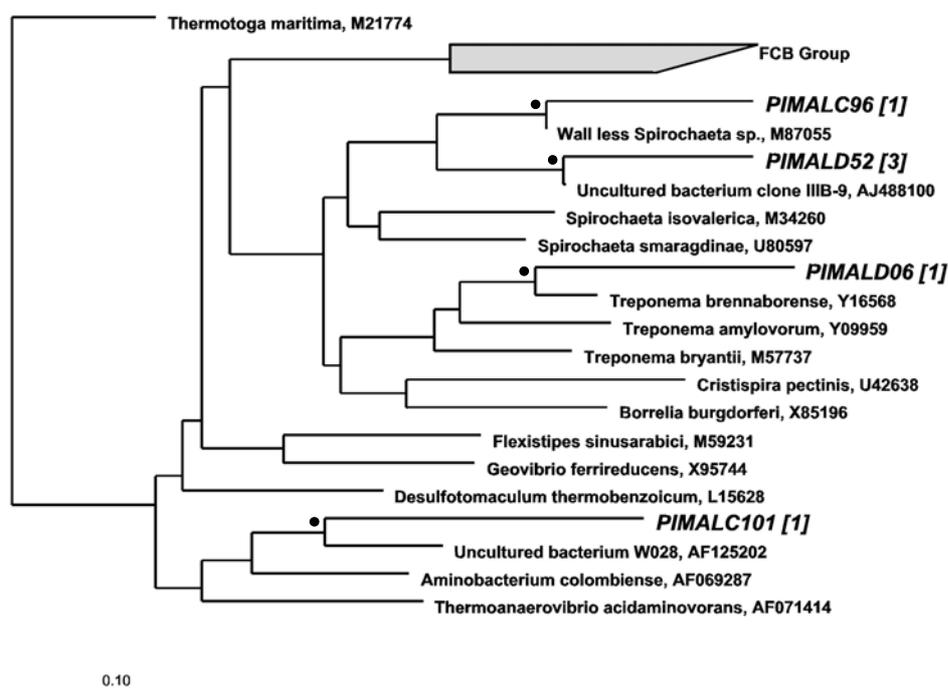


Figure 5.8. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au Spirochetes et apparentées (RDP Reg. No 2.27) et à l'assemblage *Flexistipes sinusarabici* (RDP reg. no. 2.14). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

⁷ RDP Reg. No 2.15.1.2.6.

5.2.2.2.8. *Proteobacteria* (RDP reg. no. 2.28)

Quatre phylotypes ont été affiliés à ce groupe avec une similarité moyenne de 94 % (Fig. 5.9). Deux appartiennent à la sous-division *gamma* dont un (PIMALE82) a été identifié comme *Pseudomonas halodenitrificans* (98 % de similarité), un micro-organisme hétérotrophe dénitrifiant isolé d'une aquifère contaminée par du lisier d'une exploitation porcine. Un autre appartient à la sous-division *alpha* (PIMALE110). Il a été identifié comme le micro-organisme hétérotrophe dénitrifiant *Paracoccus denitrificans* avec une similarité de 95 % et un bootstrap de 98 %. Le dernier, PIMALD71 est affilié à la sous-division *delta* et est seulement modérément lié à une séquence du tractus digestif porcine (90 % de similarité et bootstrap de 99 %).

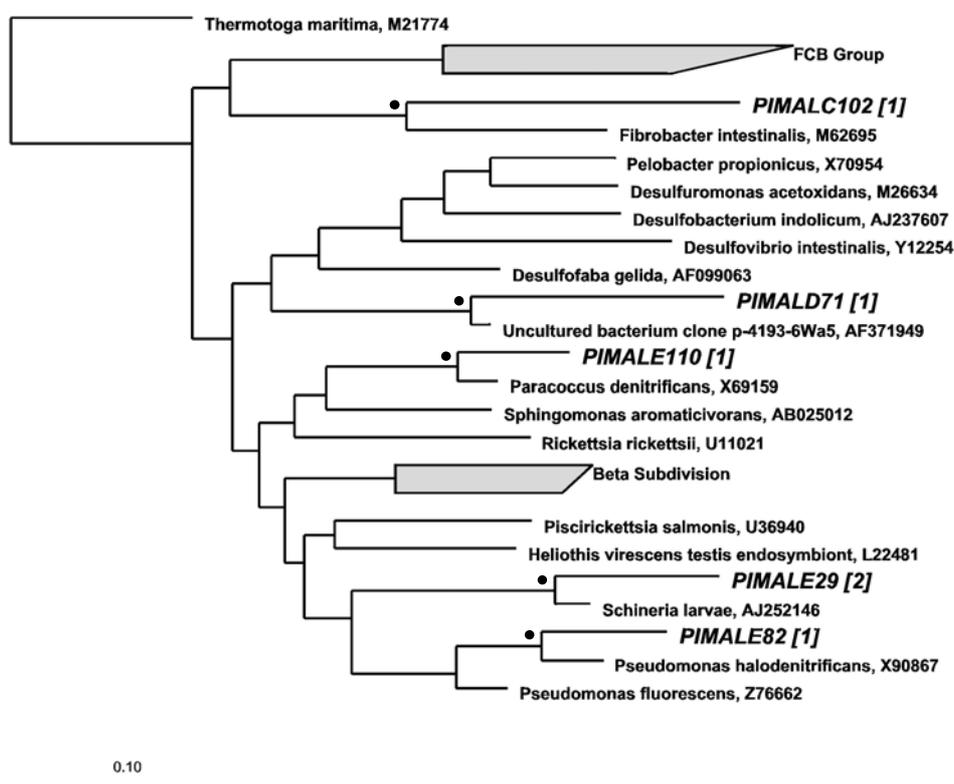


Figure 5.9. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au *Proteobacteria* (RDP reg. no. 2.28) et au groupe *Fibrobacter* (RDP reg. no. 2.25). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

5.2.2.2.9. Groupes phylogénétiques minoritaires

Les deux séquences bactériennes restantes forment deux phylotypes. Le phylotype PIMALC102 est faiblement lié à *Fibrobacter intestinalis* (88 % de similarité mais une

valeur de bootstrap de 99 %). Le phylotype PIMALC101, faiblement lié à une séquence de micro-organisme isolé de la cavité orale humaine (82 % de similarité et bootstrap de 92 %), appartient à l'assemblage *Flexistipes sinusarabici* (RDP reg. no. 2.14) (**voir figures 5.7 et 5.9**).

5.2.2.3. Diversité et abondance des *Archaea*

Les séquences d'ADNr 16S du domaine *Archaea* sont le résultat d'un seul clonage PIMADF (44 séquences analysées) ayant un pourcentage d'efficacité de clonage de 95 %. Les 43 séquences analysées, après le retrait d'une chimère, présentent une diversité moindre que celle des bactéries et définissent 8 phylotypes (**Tableau 5.3**). Ces 8 phylotypes sont tous très proches (plus de 94 % de similarité) de séquences déjà connues originaires d'intestins d'animaux ou de lisier de porc. Trois d'entre eux s'intègrent dans un groupe monophylétique composé exclusivement de micro-organismes non cultivés et faiblement lié aux *Archaea* non méthanogènes *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus oshimae* et *Ferroplasma acidophilum*. Les autres phylotypes appartiennent aux groupes des *Methanomicrobiales* et *Methanobacteriales*. Aucune séquence proche de méthanogènes acétotrophes n'a été observée. Cette caractéristique correspond aux observations effectuées sur les systèmes digestifs animaux où les acétotrophes sont manquantes à cause de l'absorption des acides gras volatils par l'intestin des animaux.

5.2.2.3.1. Groupe d'*Archaea* non cultivées.

Le phylotype PIMADF86 contient 27 séquences et domine largement la banque *Archaea*. Avec les phylotypes PIMADF16 et PIMADF53, il représente 70 % des séquences *Archaea*. Ces trois phylotypes sont très proches (≥ 97 % de similarité) de séquences isolées d'une fosse de stockage de lisier de porcs (Whitehead et Cotta, 1999). Ils appartiennent à un groupe phylogénétique composé exclusivement de séquences de micro-organismes non cultivés obtenues de divers environnements anaérobies :

- Digesteurs anaérobies traitant des effluents de diverses origines, vinasses, lisiers, brasseries etc. (vadin CA11 et vadin DC79, 130D, Andigpeak12 ; (Godon *et al.*, 1997 ; Leclerc *et al.*, In press).
- Aquifère contaminée par des hydrocarbures et des solvants chlorés (WCHD3-02, WCHD3-16 et WCHD3-33 ; (Dojka *et al.*, 1998).

- Fosse de stockage de lisier de porcs (Ar21, Ar26 et Ar28 ; (Whitehead et Cotta, 1999).
- Extraction de liquide du rumen bovin (M1, M2, M7 ; (Tajima *et al.*, 2001).
- Tractus digestif de termites (RS406 ; (Shinzato *et al.*, 1999); P3-Ar-9, P5-Ar-11, P4b-Ar-25 et P4b-Ar-19 ; (Friedrich *et al.*, 2001) (**Fig. 5.10**).

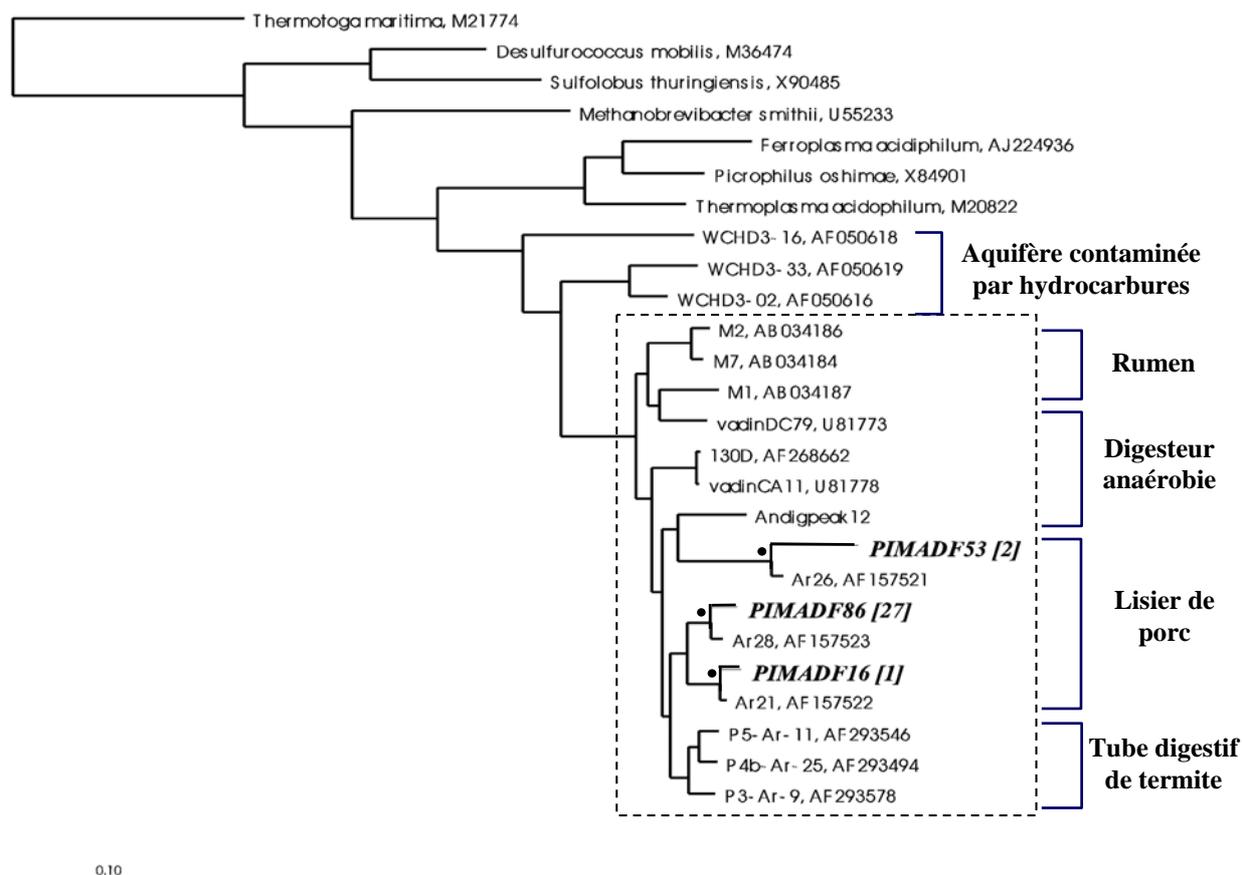


Figure 5.10. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S non cultivées. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a). Le carré en pointillé montre les séquences qui appartiennent au groupe CA11.

Le calcul de la matrice de distance montre que les séquences de ce groupe présentent un minimum de 90 % de similarité entre elles. Ces résultats suggèrent l'existence d'un nouveau groupe *Euryarchaeota* typique des environnements anaérobies neutrophiles et mésophiles. Nous proposons de le nommer **CA11**, en raison de la première séquence publiée de ce groupe (Godon *et al.*, 1997). Les fonctions des micro-organismes appartenant à ce groupe sont inconnues car les séquences des micro-organismes cultivés les plus proches sont phylogénétiquement trop éloignées. Il s'agit des *Archaea* non méthanogènes *Thermoplasma acidophilum* pour les phylotypes

PIMADF86 et PIMADF16 avec une très faible similarité de 77 % et de 75 % respectivement, et de *Picrophilus oshimae* pour PIMADF53 avec 75 % de similarité.

5.2.2.3.2. *Methanobacteriales* et *Methanomicrobiales* (RDP reg. no. 1.1.2 et 1.1.3.1, respectivement).

Les cinq autres phylotypes *Archaea* (30 % de séquences) ont été affiliés aux groupes méthanogènes *Methanobacteriales* et *Methanomicrobiales* (**Fig. 5.11**). Ces phylotypes sont proches de séquences de micro-organismes méthanogènes hydrogénotrophes isolés du tube digestif d'animaux (Robinson *et al.*, 1989 ; Garcia *et al.*, 2000).

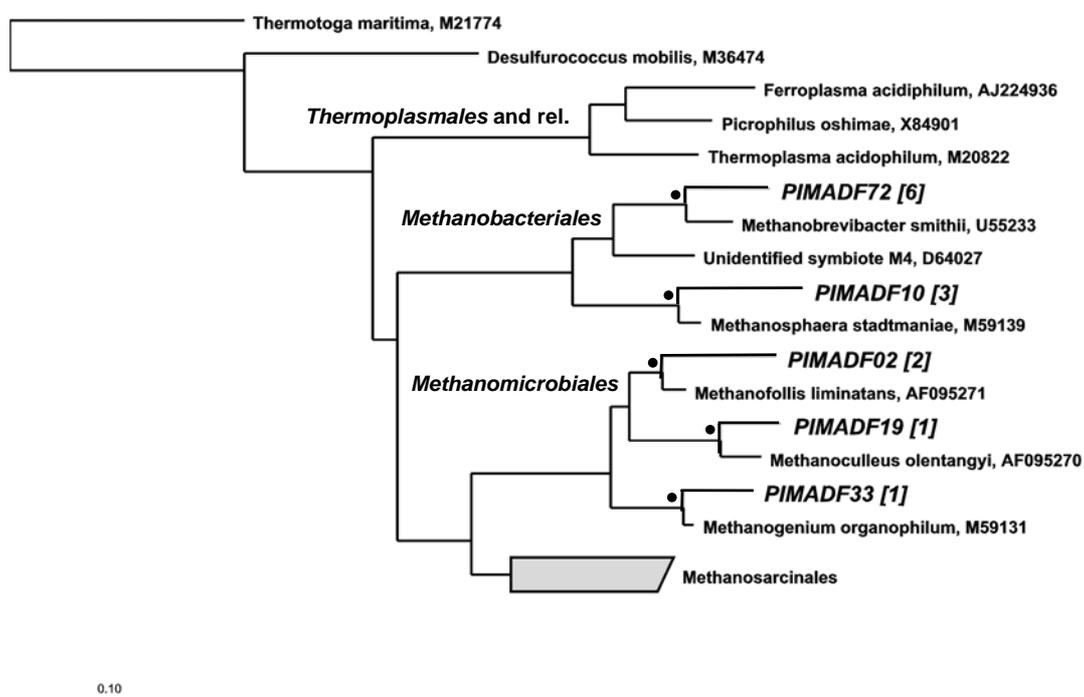


Figure 5.11. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées aux groupes *Archaea* méthanogènes. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

Deux phylotypes (PIMADF10 et PIMADF72) s'intègrent dans le groupe des *Methanobacteriales*. Tous les deux avec un bootstrap de 78 %. PIMADF10 est lié à *Methanosphaera standtmaniae* (94 % de similarité) (**voir Annexes : Tableau a5.1**). PIMADF72 a été identifié comme *Methanobrevibacter smithii* (98 % de similarité), le méthanogène le plus abondant trouvé par culture dans les environnements intestinaux. Le genre *Methanobrevibacter* contient plusieurs méthanogènes symbiotiques

apparentées à *Methanobrevibacter smithii* que l'on peut trouver associées aux eucaryotes des environnements intestinaux et des sédiments (Finlay et Fenchel, 1991 ; Shinzato *et al.*, 1999 ; Tokura *et al.*, 2000).

Trois phylotypes sont affiliés aux *Methanomicrobiales*. Ils sont proches de *Methanoculleus olentangyi* (PIMADF19, 99 % de similarité), *Methanofollis liminatans* (PIMADF02, 94 %) et *Methanogenium organophilum* (PIMADF33, 96 %). Tous ont un fort bootstrap entre 81 % et 92 %.

5.2.2.4. Diversité et abondance des eucaryotes

La banque d'ADNr 18S du domaine *Eucarya* est le résultat d'un seul clonage nommé PIMAEC (34 séquences analysées) présentant un pourcentage d'efficacité de clonage de 90 %. Les amorces utilisées pour la réalisation de cette banque ont été publiées lors de l'investigation de la communauté eucaryote unicellulaire de sédiments anoxiques marins présentant une très grande diversité (Edgcomb *et al.*, 2002). L'analyse des 33 séquences eucaryotes du lisier, après retrait d'une chimère, n'a défini que 5 phylotypes et suggère une faible diversité (**Tableau 5.3 et Figure 5.12**). Deux d'entre eux sont affiliés à des genres de parasites potentiels.

5.2.2.4.1. *Nematoda* (RDP reg. no. 3.10.10.4.)

Le phylotype le plus nombreux (PIMAEC05, 27 clones) est affilié avec une similarité de 99 % à un nématode isolé du sol, *Rhabditella axei*. La présence de cet eucaryote multicellulaire qui monopolise 80 % des séquences analysées a biaisé l'abondance et la diversité de la banque car sa présence a augmenté la quantité d'ADNr par rapport à un seul organisme.

5.2.2.4.2. *Stramenopiles* (RDP reg. no. 3.14)

Ce groupe phylogénétique est représenté par le phylotype PIMAEC08 qui est proche de *Blastocystis* sp. SY94-7 (97 % de similarité) et de *Blastocystis hominis* (86 % de similarité). *Blastocystis* sp. SY94-7 a été isolé d'excréments de porcs et d'animaux d'un zoo (Quilez *et al.*, 1995 ; Abe *et al.*, 2002). Ce parasite a été détecté par microscopie photonique dans des excréments de porcs sains et diarrhéiques sans qu'aucune corrélation n'ait été trouvée entre l'intensité de l'infection du Blastocyste et la fréquence des diarrhées (Quilez *et al.*, 1995 ; Abe *et al.*, 2002). *Blastocystis hominis* est un

parasite protozoaire isolé du tractus intestinal humain. Ces deux parasites ont été longtemps confondus en raison de l'incapacité de les distinguer par des méthodes de microscopie standard. L'utilisation de l'ADNr 18S semble aujourd'hui montrer l'existence d'une grande diversité génétique parmi les Blastocystes isolés d'hôtes différents et suggère que plus d'une espèce de Blastocyste infecte les humains (Noël *et al.*, 2003). Notre travail confirme la présence de ce parasite chez le porc.

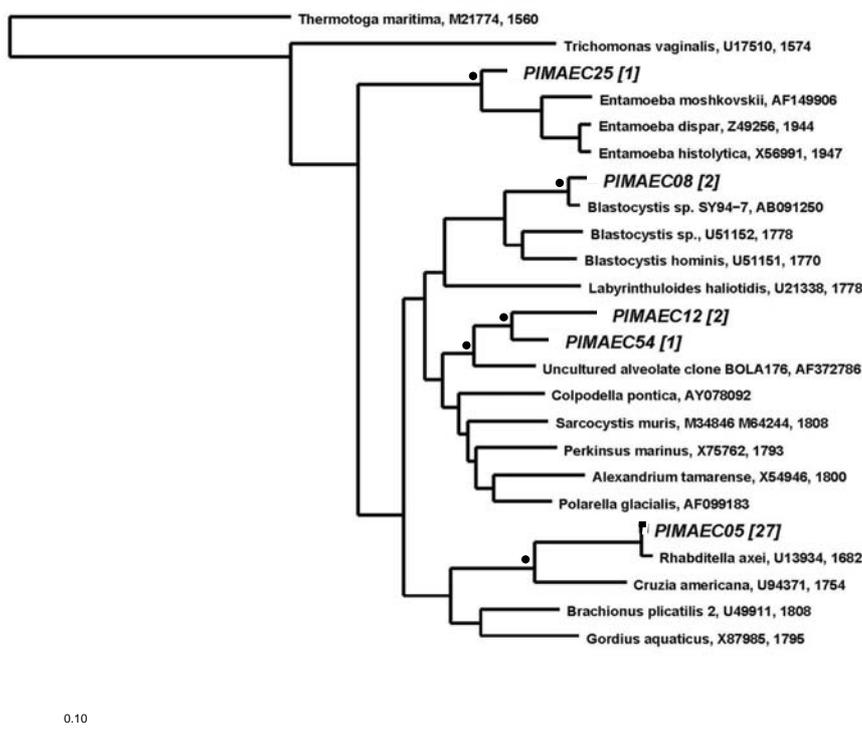


Figure 5.12. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 18S partielles affiliées au domaine *Eucarya*. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 5.2 (a).

5.2.2.4.3. *Alveolata* (RDP reg. no. 3.13)

Deux phylotypes (PIMAEC12 et PIMAEC54) ont été affiliés au groupe *Alveolata*. PIMAEC12 est lié à une séquence récupérée des sédiments d'une lagune. L'eucaryote connu le plus proche est *Colpodella* sp. (79 % de similarité). Les membres du genre *Colpodella* sont des biflagellés qui vivent sous la forme de cellules libres et qui sont des prédateurs d'autres protistes (Sindall *et al.*, 2001 ; Kuvardina *et al.*, 2002).

5.2.2.4.4. *Entamoebidae* (RDP reg. no. 3.4.1)

Le phylotype PIMAEC25 affilié à ce groupe est proche de *Entamoeba moshkovskii* avec une similarité de 91 %. *E. moshkovskii* est une amibe qui vit libre dans les eaux résiduelles et les sédiments des rivières, des fleuves et des lacs (Haque *et al.*, 1998).

5.2.2.5. Origine des séquences apparentées aux phylotypes du lisier

Si tous les phylotypes *Archaea* se sont révélés proches de séquences connues originaires de tubes digestifs animaux ou de lisier de porcs, les phylotypes bactériens sont liés à des séquences d'origines diverses (**Tableau 5.4**). Cependant, 58 % des phylotypes bactériens (représentant 62 % des séquences bactériennes) ont pour plus proches parents une séquence originaire de tubes digestifs animaux, de fèces ou de déjections animales ; la moitié d'entre eux avec plus de 97 % de similarité. Ainsi, environ 18 % des phylotypes bactériens sont proches de séquences de tube digestif de porc. Pour les phylotypes restants : 13 % (16 % des séquences) sont proches de séquences du sol ou de sédiments ; 5,5 % (5 % des séquences) sont proches de séquences du rumen et 21 % (17 % des séquences) sont liés à des séquences originaires d'écosystèmes divers.

Tableau 5.4. Origine et similarité des séquences apparentées aux phylotypes *Bacteria* du lisier.

	Différentes niches ⁸ des séquences apparentées						
	Tractus Intestinal d'animaux	Fèces	Déjections animales	Rumen	Sol	Sédiments	Autres
BACTERIA							
Micro-organismes cultivés							
similarité supérieure à 97 %	5	5	1	0	0	0	3
similarité inférieure à 97 %	4	6	0	1	8	3	16
Micro-organismes non cultivés							
similarité supérieure à 97 %	15 ^a	1	6	0	0	0	1
similarité inférieure à 97 %	15 ^a	1	4	5	1	2	5
Total des phylotypes	39	13	11	6	9	5	25
Pourcentage des clones	31	18	13	5	11	5	17

a. Toutes les séquences les plus proches proviennent du tractus gastro-intestinal de porc (Leser *et al.*, 2002).

⁸ La niche est l'habitat physique et fonctionnel d'une espèce dans un écosystème.

Sur les 52 phylotypes affiliés à des micro-organismes cultivés, seulement 14 (soit 13 %) présentent une similarité de séquence supérieure à 97 % avec des micro-organismes connus et peuvent être considérés comme identifiés.

5.2.3. Construction de la chaîne trophique.

Les travaux réalisés donnent une image de la communauté microbienne et des propriétés physico-chimiques du lisier au moment du prélèvement mais ils ne donnent pas de réponse aux problèmes posés par le lisier. Pour tenter d'expliquer le fonctionnement de l'écosystème représenté par le lisier, nous avons effectué l'exercice de reconstruire une chaîne trophique à partir de la structure de la communauté microbienne observée, des connaissances actuelles sur les principaux groupes microbiens rencontrés, des métabolites présents dans le lisier, et des voies métaboliques connues dans les écosystèmes anaérobies naturels et industriels.

Les informations disponibles sont :

- La structure globale de la communauté microbienne, avec l'absence de méthanogènes acétotrophes connues, ressemble à celle des systèmes digestifs animaux, où la plupart du méthane est produit par la voie de l'hydrogène.
- Les paramètres physico-chimiques sont proches de ceux rencontrés dans les digesteurs anaérobies industriels, excepté pour les fortes concentrations en AGV, ammoniacque et sulfure d'hydrogène.
- L'ensemencement du lisier est effectué presque exclusivement par les fèces de porcs.
- 43 % des phylotypes bactériens du lisier sont proches de séquences isolées du tractus digestif de porc mais des groupes microbiens spécifiques au lisier semblent exister parmi les *Clostridium*, les *Mycoplasma* et les *Bacteroides*.
- Le groupe *Archaea* dominant, de fonction inconnue, pourrait être typique de systèmes digestifs animaux.
- Les eucaryotes trouvés appartiennent à des groupes typiques des intestins animaux. La plupart sont des prédateurs ou des mutualistes qui ont une relation symbiotique avec les *Archaea* méthanogènes affiliées au groupe *Methanobacteriales*.

Le scénario envisagé est le suivant (Fig. 5.13) :

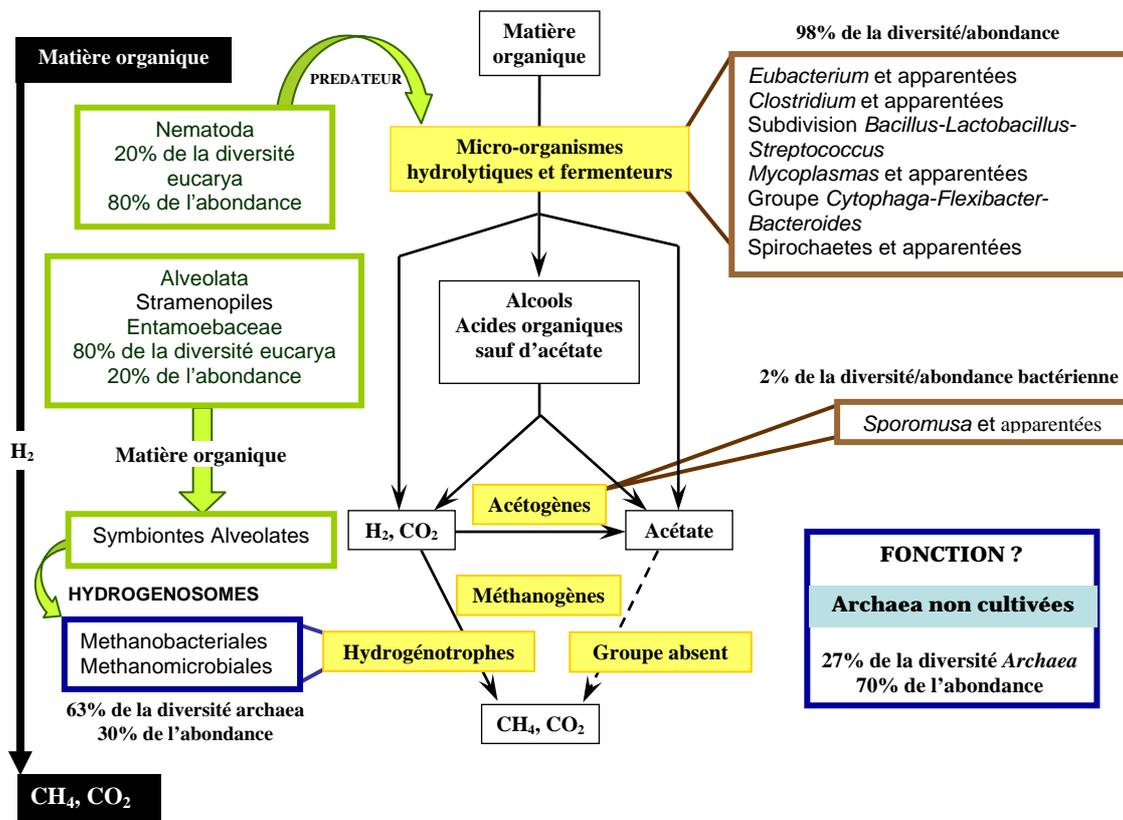


Figure 5.13. Ecosystème anaérobie hypothétique du lisier de porc. Les groupes microbiens des domaines *Bacteria* (marron), *Archaea* (bleue) et *Eucarya* (verte) sont indiqués dans les carrés. Le groupe absent correspond aux méthano-gènes acétotrophes.

Les préfosse des bâtiments sont nettoyées et désinfectées entre chaque utilisation. L'inoculum principal du lisier est la communauté microbienne présente dans le tractus intestinal des porcs. Cette communauté est orientée vers la production d'AGV qui sont absorbés à 90 % par l'épithélium intestinal du porc (Cummings *et al.*, 1987 ; Garcia *et al.*, 2000). La faible disponibilité en AGV (particulièrement en acétate) pendant le processus de digestion limite le développement des micro-organismes acétotrophes. Les *Archaea* méthano-gènes apportées par les fèces des animaux sont donc essentiellement hydrogénéotrophes.

Lorsque la communauté du tractus digestif porcin tombe dans la préfosse, elle subit un choc de température qui peut ralentir la croissance de nombreuses espèces. A ce titre,

les groupes microbiens à croissance lente, comme les *Archaea*, sont défavorisés. Mais les changements les plus importants sont surtout l'accumulation rapide de fortes concentrations en ammoniac (consécutives à l'hydrolyse de l'urée) et en AGVs (conséquence de l'absence d'absorption par le tube intestinal porcin). Les conditions de potentiel redox et de pH restent cependant favorables à la digestion anaérobie. Les groupes bactériens dominants du tube digestif porcin vont s'adapter aux nouvelles conditions environnementales et poursuivre les premières étapes de la dégradation de la matière organique (hydrolyse et fermentation - acidogénèse) qui conduisent à la production d'AGV. Ces groupes microbiens sont majoritairement des bactéries fermentaires : *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, *Mycoplasma* et *Bacteroides*. Environ 61 % des phylotypes bactériens trouvés dans le lisier sont proches de séquences appartenant à des micro-organismes connus pour produire des composés malodorants.

Les genres microbiens présents dans le lisier et impliqués dans la production d'AGV sont : *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Megasphaera*, *Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Ruminococcus* et *Selenomonas* (Bergey, 1984 ; Zhu et Jacobson, 1999). D'autres genres seraient aussi impliqués dans la production d'acides organiques : *Roseburia*, *Fusobacterium* et *Butyvirio* (Barcenilla *et al.*, 2000). (Allison, 1978) avait mis en évidence la production d'AGV ramifiés par des *Selenomonas* entre autres.

En l'absence de groupes microbiens consommateurs d'AGV, essentiellement les *Archaea* acétotrophes, ceux-ci vont s'accumuler jusqu'à un taux défavorable pour la digestion anaérobie. La préfosse de stockage peut alors être vue comme un digesteur anaérobie qui reçoit en continu une surcharge organique forte lorsque les excréments tombent dans la préfosse (DCO soluble = 32 g/L). Dans notre étude (**Figure 5.14**), la dégradation des déjections a conduit à une accumulation d'AGVs jusqu'à 16 g/L, dont 9 g/L d'acétate, en trois semaines de stockage. Normalement, dans un digesteur anaérobie en fonctionnement, la concentration en acétate dépasse rarement une concentration comprise entre 1 et 10 mM (0,06 à 0,6 g/L), les autres AGV étant trouvés à des concentrations inférieures.

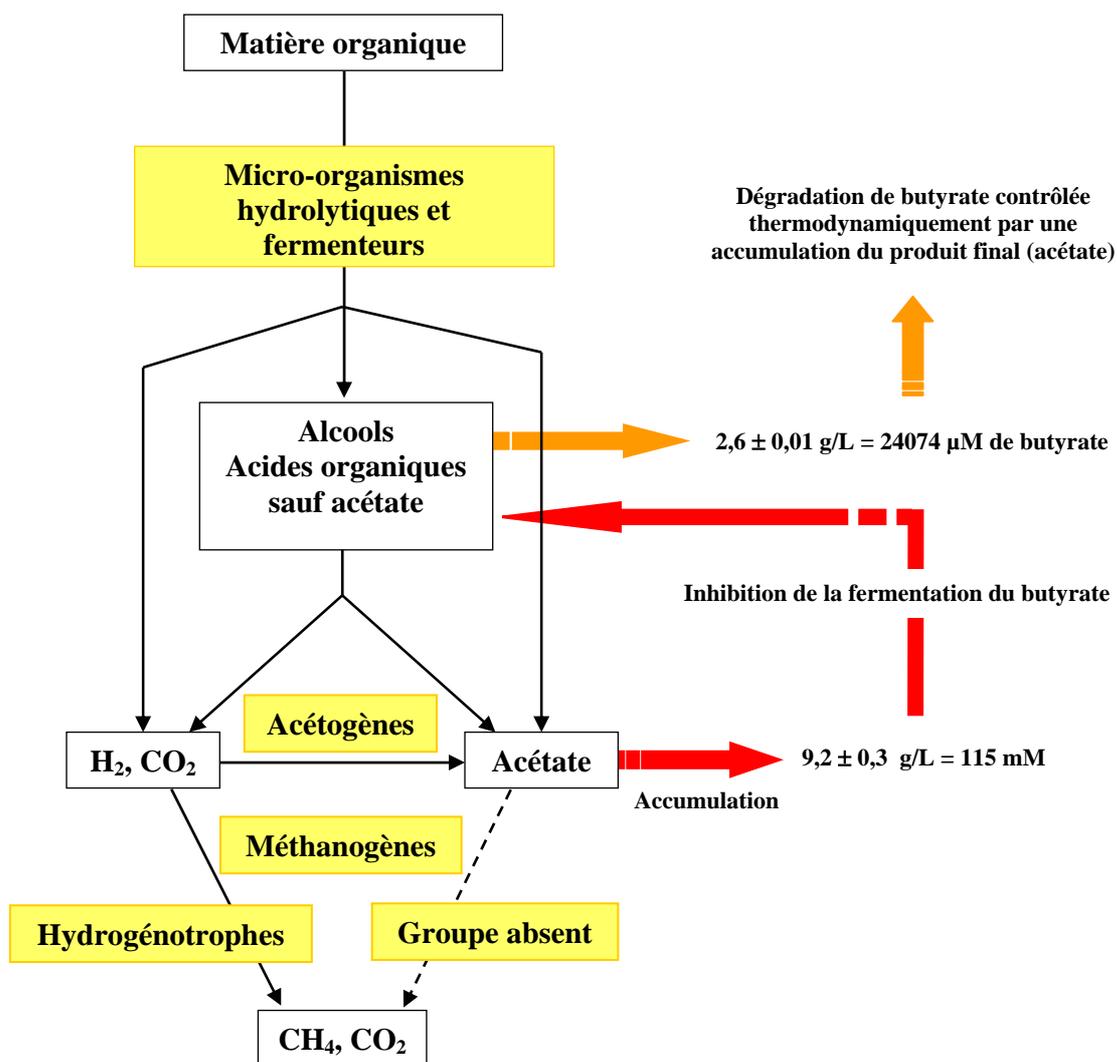


Figure 5.14. Effet de l'acétate dans l'écosystème. Les groupes absents sont les méthanogènes acétotrophes et les bactéries sulfato-réductrices.

L'accumulation d'AGV dans les digesteurs biologiques provoque un dysfonctionnement du système anaérobie car il casse l'association syntrophique entre les bactéries acétogènes et acétotrophes et rend tout le processus de digestion anaérobie thermodynamiquement défavorable (Kroeker *et al.*, 1979 ; Aguilar *et al.*, 1995 ; Vavilin et Lokshina, 1996 ; Warikoo *et al.*, 1996 ; Mosche et Jordening, 1999 ; Jackson et McInerney, 2002). Cette hypothèse est à rapprocher de l'observation de la faible diversité et représentativité des groupes acétogènes et homoacétogènes dans le lisier comparé au tube digestif porcin (comme le groupe *Sporomusa* par exemple), même si plusieurs populations de *Clostridium* sont capables d'effectuer l'acétogénèse.

Ainsi, dans une étude effectuée pour expliquer l'effet des AGV sur les systèmes de digestion anaérobie, (Beaty et McInerney, 1989) ont montré l'inhibition du catabolisme du butyrate par l'ajout d'acétate (0,870 g/L) dans des co-cultures de *Syntrophomonas wolfei* (une bactérie acétogène) et de l'*archaea* hydrogénotrophe *Methanospirillum hungatei*. L'addition d'une *archaea* méthanogène acétotrophe, comme *Methanosarcina barkeri*, rétablit la biodégradation du butyrate. En bref, l'activité d'un micro-organisme acétotrophe comme une *archaea* méthanogène ou une bactérie sulfato-réductrice est importante pour la dégradation syntrophique des AGV lorsque de l'acétate est présent dans le système.

Dans ce scénario, nous supposons que la voie de production du méthane à partir de l'hydrogène fonctionne correctement parce qu'il existe une grande abondance et diversité de phylotypes liés aux *archaea* méthanogènes hydrogénotrophes. Ces *archaea*, typiques des environnements intestinaux, peuvent être placées comme hydrogénotrophes indépendantes (*Methanomicrobiales*) ou en association symbiotique (*Methanobacteriales*, surtout *Methanobrevibacter*) avec certains groupes d'*Eucarya* unicellulaires anaérobies ou microaérophiles comme les *Alveolata*. En effet, dans le rumen et l'intestin de termites, ces eucaryotes possèdent des structures spécialisées, nommées hydrogénosomes, capables de réaliser les dernières étapes du métabolisme énergétique anaérobie (Finlay et Fenchel, 1991 ; Ohkuma *et al.*, 1995 ; Shinzato *et al.*, 1999). L'utilisation de l'hydrogène par les *archaea* méthanogènes symbiotiques va favoriser la dégradation rapide de la matière organique (Hackstein *et al.*, 1999 ; Tokura *et al.*, 2000). Les autres eucaryotes observés dans l'écosystème, comme les *Nematoda* et *Entamoebidae*, ont un rôle de prédateur des bactéries et de saprophyte, respectivement.

Le grand absent de ce scénario est le groupe d'*Archaea* non cultivées affilié à CA11 et pourtant dominant de l'inventaire de ce domaine. Sa fonction est inconnue même si les séquences de ce groupe sont régulièrement présentes et abondantes dans divers tractus digestifs animaux (termite, blatte, rumen). Des clonages réalisés sur plusieurs fèces de porcs nous ont montré qu'il était déjà présent et dominant dans le tractus digestif du porc. Cette observation, ainsi que l'accumulation des AGV dans le lisier en présence de ce groupe microbien, suggère qu'il n'est pas actif comme acétotrophe dans le lisier. Les micro-organismes les plus proches (les *Thermoplasmatales*), mais quand même très éloignés phylogénétiquement, possèdent des activités protéolytiques importantes (Schleper *et al.*, 1995 ; Yasuda *et al.*, 1995 ; Golyshina *et al.*, 2000).

5.2.4. A la recherche de l'effet du sulfure d'hydrogène

La concentration de sulfure d'hydrogène (H₂S) mesurée dans le lisier a été de 0,326 ± 0,01 g/L. Son effet inhibiteur est généralement associé à sa forme non dissociée qui a été évaluée à une concentration de 0,198 ± 0,01 g/L dans la fraction totale à pH 6,85 (calculé à 20°C selon (APHA *et al.*, 1985 ; Speece, 1996). Divers travaux, qui ont étudié l'effet de l'H₂S sur le fonctionnement des digesteurs anaérobies, ont montré que cette concentration a un effet inhibiteur significatif sur les populations d'*Archaea* méthanogènes (Parkin *et al.*, 1983 ; Koster *et al.*, 1986a ; Karhadkar *et al.*, 1987 ; Clancy *et al.*, 1992 ; Speece, 1996). Une concentration de sulfure⁹ assez basse, de 50 mg/L S²⁻, commence à inhiber les *Archaea* méthanogènes dans les systèmes fermés (Parkin *et al.*, 1983) (**Figure 5.15**). Dans certaines conditions, cette inhibition par l'H₂S a pu être levée par l'ajout de métaux lourds (cuivre ou zinc) qui complexent l'H₂S (Jin *et al.*, 1998).

La forte concentration en H₂S du lisier pourrait avoir plusieurs origines :

- la dégradation anaérobie des protéines, qui peut être réalisée par les bactéries protéolytiques affiliées aux *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lachnospira* et *Butyrivibrio*, est probablement la voie majoritaire (Zehnder et Stumm, 1988).
- la production de sulfure d'hydrogène comme mécanisme de résistance aux métaux lourds est un phénomène assez répandu parmi les micro-organismes. En effet, le sulfure d'hydrogène se complexe avec ces métaux pour former des sulfures insolubles (Sercombe, 1995). Ce phénomène a été décrit pour l'*Archaea* *T. acidophilum* qui est capable de résister à 10 mM de ZnSO₄ et 1 mM de CuSO₄ quand elle est cultivée avec du soufre élémentaire pour produire du H₂S (Yasuda *et al.*, 1995). *Clostridium cochlearium*, qui est très proche phylogénétiquement de PIMALD11, a les mêmes propriétés (Hughes et Poole, 1989 ; Hao, 2000). Si l'on considère que le lisier est particulièrement riche en cuivre et en zinc (837 et 1301 mg/Kg MS, respectivement), cette condition de stress pourrait sélectionner et/ou induire des micro-organismes producteurs d'H₂S.
- la réduction dissimilatrice des sulfates. Même si aucune séquence liée aux bactéries sulfato-réductrices (BSR) n'a été trouvée dans notre inventaire, des travaux antérieurs ont évalué le nombre de BSR dans le colon du porc entre 6 et 6x10⁷ (Butine et Leedle, 1989). Ce nombre très variable dépend de la compétition des

⁹ Ajouté comme Na₂S · 9 H₂O.

BSR avec les méthanogènes hydrogénotrophes pour le H_2/CO_2 et des concentrations de cuivre et de zinc dans le milieu. Ces métaux sont des inhibiteurs efficaces de la réduction dissimilatrice des sulfates (Clancy *et al.*, 1992).

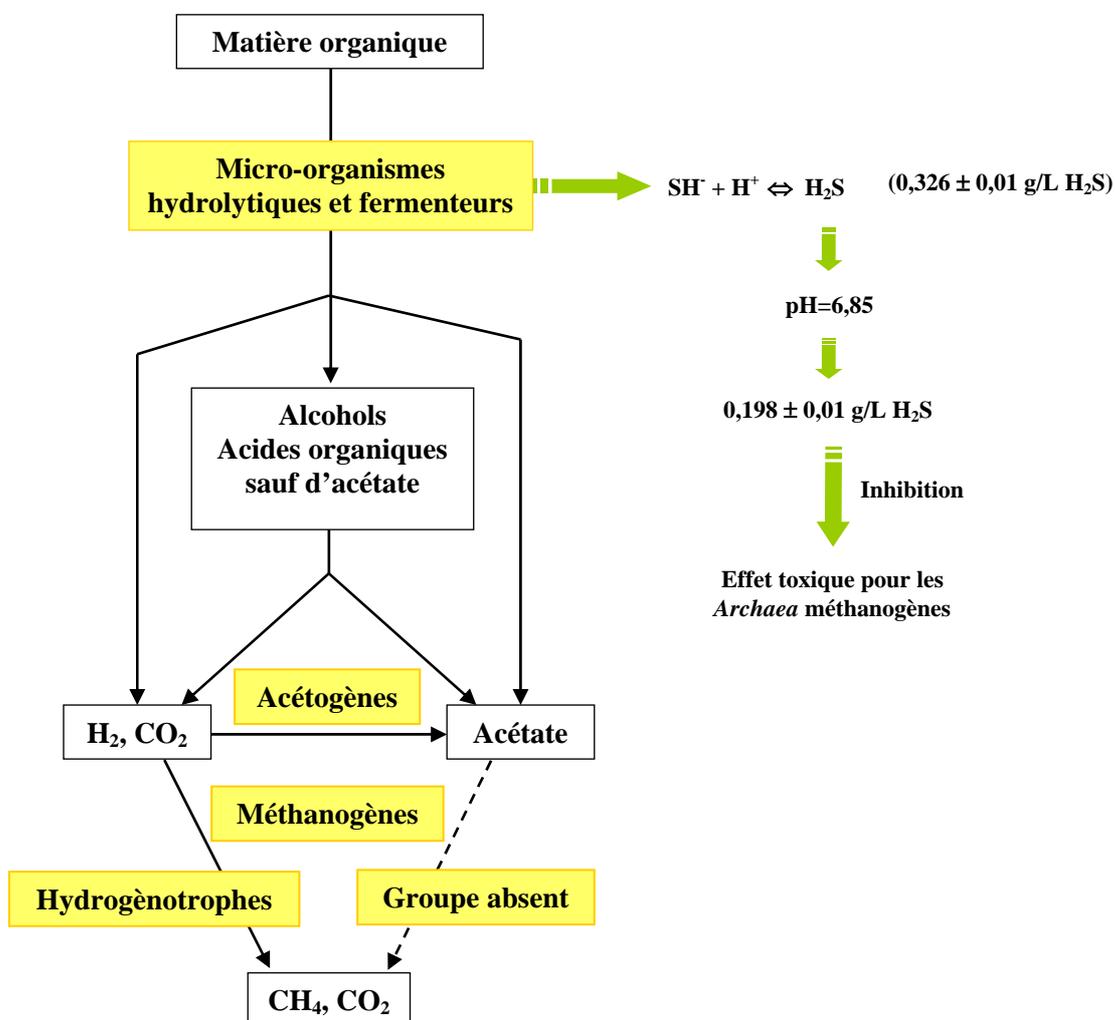


Figure 5.15. Effet du sulfure d'hydrogène dans l'écosystème. Le groupe absent correspond aux *archaea* méthanogènes acétotrophes et aux bactéries sulphato-réductrices.

5.2.5. A la recherche de l'effet de l'ammoniac

Des phénomènes inhibiteurs de l'écosystème anaérobie du lisier sont souvent attribués à sa concentration élevée en azote ammoniacal (dans notre étude $3,8 \pm 0,6$ g $N-NH_3/L$ dans sa fraction soluble). Cependant, l'effet toxique de l'azote ammoniacal est corrélé à sa concentration en ammoniac (NH_3) qui inhibe les groupes *Archaea* méthanogènes

hydrogénotrophes (Koster et Koomen, 1988b). Le contrôle du pH peut réduire la toxicité du NH_3 en maintenant l'équilibre du côté de l'ammonium (NH_4^+), qui n'est pas toxique pour le système. La concentration en NH_3 de la fraction soluble du lisier étudié a été évaluée à $0,02 \pm 0,001$ g N- NH_3 /L au pH 6,85 mesuré (calculé à 20°C selon (Williams, 1984 ; Wiesmann, 1994) (**Figure 5.16**). Cette faible concentration ne devrait pas avoir un effet significatif sur les populations microbiennes de notre écosystème. Cependant, son effet potentiel reste important dans le cas d'un possible changement de pH dans le système.

La forte concentration en ammoniac observée dans le lisier a pour origine principale l'hydrolyse de l'urée qui est indépendante de l'activité microbienne du lisier (Béline *et al.*, 1998b). La production de NH_4^+ par la minéralisation des protéines est certainement plus faible, surtout si l'on considère que le lisier étudié a été stocké pendant une période de temps assez courte (McCrary et Hobbs, 2001). Cependant, l'existence d'une flore microbienne productrice d'ammoniac a été observée à plusieurs reprises dans des écosystèmes anaérobies :

- (Cotta *et al.*, 2003) ont isolé, à partir d'une fosse de stockage de lisier, plusieurs bactéries fermentaires d'acides aminés affiliées aux groupes *C. coccoides* (RDP No. Reg. 2.30.4.1), *C. botulinum* (RDP No. Reg. 2.30.9.2) et au groupe *Enterococcus* (RDP No. Reg. 2.30.7.20). Ces groupes représentent 16 % des séquences de notre inventaire *Bacteria* du lisier.
- dans le rumen, des micro-organismes fermentant les acides aminés et hyper-producteurs d'ammoniac ont été isolés (Russell *et al.*, 1988 ; Attwood *et al.*, 1998). Ils appartiennent aux groupes *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* et *Eubacterium nodatum* (Attwood *et al.*, 1998).

En l'absence d'oxygène, l'ammoniac produit s'accumule car il ne peut pas être nitrifié. Seules des traces de nitrite ont été trouvées dans le lisier. Les bactéries oxydantes de l'ammoniac sont généralement peu présentes dans les lisiers (10^2 UFC/mL) (St-Arnaud *et al.*, 1991). Dans notre étude, deux phylotypes (PIMALE82 et PIMALE110) sont liés à des bactéries nitrifiantes hétérotrophes, *Pseudomonas halodenitrificans* et *Paracoccus denitrificans* respectivement (Moir *et al.*, 1996 ; Baker, 1998 ; Bothe *et al.*, 2000).

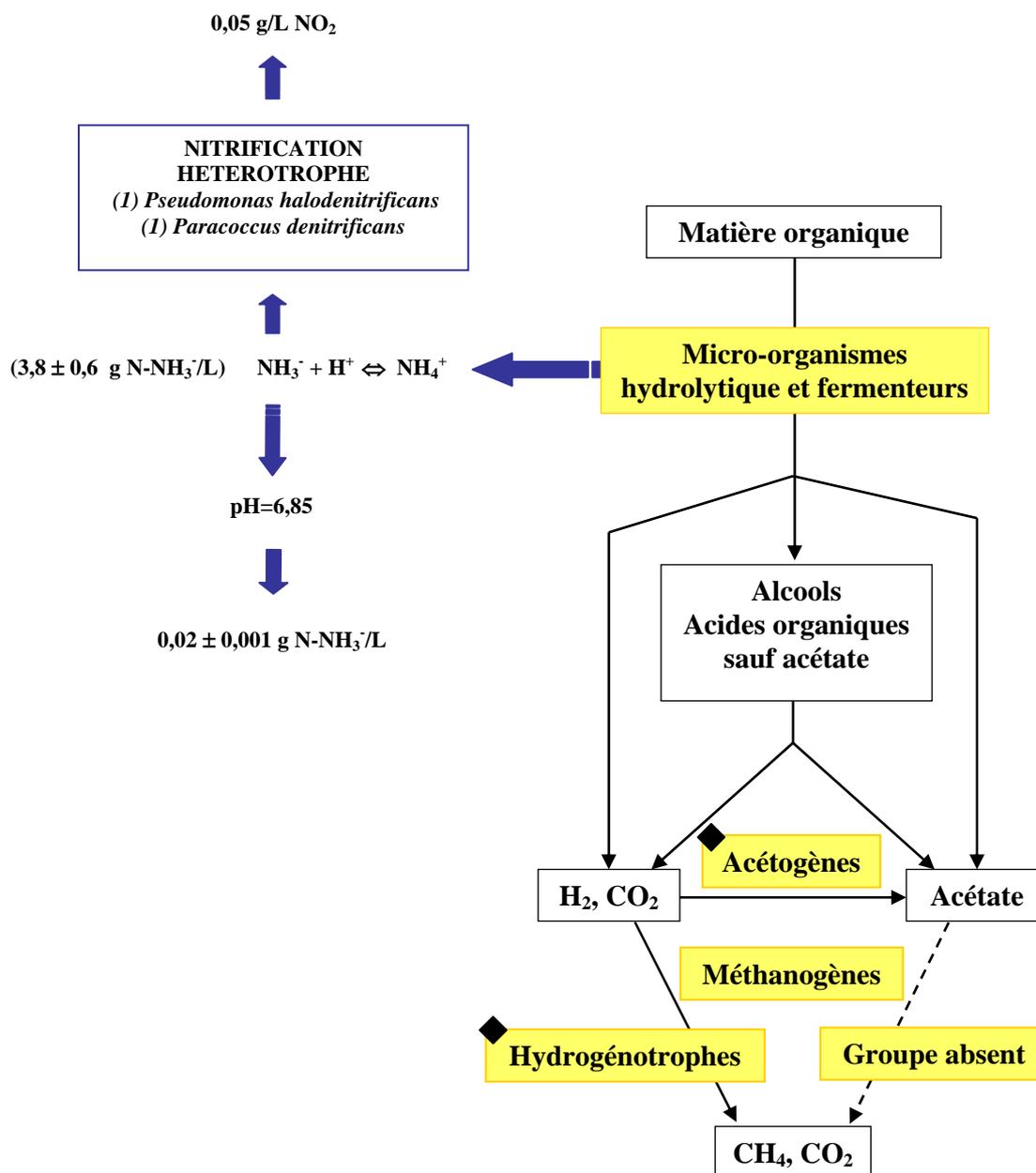


Figure 5.16. Effet de l'ammoniac dans l'écosystème. Les groupes absents sont les *archaea* méthanogènes acétotrophes et les bactéries sulfato-réductrices. Ces dernières produisent de l' H_2S à la place du CH_4 . Le losange noir (◆) indique les groupes qui pourraient être inhibés par une forte concentration en ammoniac.

5.3. Conclusion

Ce travail donne une description de la communauté microbienne d'un lisier de porcs d'engraissement, prélevé en sortie de bâtiment d'élevage, et de ses conditions environnementales. Il suggère une grande différence entre la forte diversité bactérienne et la faible diversité *Archaea*. Cette différence a été observée dans divers

écosystèmes de digestion anaérobie comme un digesteur anaérobie (Godon *et al.*, 1997), le tube digestif de termite (Shinzato *et al.*, 1999 ; Hongoh *et al.*, In press), le rumen (Tajima *et al.*, 1999 ; Tajima *et al.*, 2001), une aquifère polluée (Dojka *et al.*, 1998) et des sédiments (Munson *et al.*, 1997 ; Todorov *et al.*, 2000). Elle s'explique par la simplification des substrats le long de la chaîne trophique de la dégradation anaérobie de la matière organique (Grady *et al.*, 1999).

Concernant la diversité et l'abondance microbienne trouvées dans le lisier :

- Seulement 13 % des phylotypes bactériens (23 % des séquences) détectés sont proches d'espèces cultivées.
- 48 % des phylotypes bactériens observés sont proches de séquences isolées du tractus digestif de porc (43 %) ou de lisiers (Whitehead et Cotta, 1999 ; Whitehead et Cotta, 2001 ; Leser *et al.*, 2002).
- 15 % des phylotypes bactériens sont proches de séquences originaires de systèmes digestifs humains ou bovins.
- Les phylotypes restants (37 %) sont proches de séquences provenant essentiellement d'écosystèmes d'épuration ou de milieux aquatiques.
- Dans tous les groupes bactériens rencontrés, les meilleurs scores en homologie et en nombre de séquences ont toujours été avec les séquences du tractus digestif de porc publiées par Leser *et al.* (2002).
- Il existe plusieurs groupes microbiens présentant des phylotypes qui pourraient être spécifiques au lisier parmi les *C. coccoides*, les *Mycoplasmas* et apparentées et les *archaea* affiliées à CA11.
- 61 % des phylotypes bactériens ont été affiliés à des groupes microbiens potentiellement producteurs de composés malodorants.
- La flore *Archaea* est dominée par un groupe non cultivé de fonction inconnue mais potentiellement spécifique des écosystèmes anaérobies intestinaux.
- La flore *Archaea* ressemble à celle du tractus digestif des animaux pour les groupes hydrogénotrophes.
- Les eucaryotes observés sont typiques des environnements anaérobies intestinaux. Ils sont des prédateurs et des mutualistes symbiotiques des *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes *Methanobacteriales*.
- Le lisier représente un écosystème anaérobie méthanogène par la voie de l'hydrogène typique des intestins des animaux.

- La communauté microbienne ressemble à celle du tractus gastro-intestinal du porc.

Les conditions physico-chimiques mesurées montrent que le lisier est un écosystème anaérobie mésophile, proche de la neutrophilie, contenant de fortes concentrations en AGV, sulfure d'hydrogène et ammoniac. Ces caractéristiques suggèrent un effet négatif de l'acétate et de l' H_2S sur les voies métaboliques de digestion anaérobie. L'ammoniac, au pH considéré, ne devrait pas avoir un effet important.

RESULTATS : CHAPITRE 6

CHAPITRE 6

Caractérisation physico-chimique et microbiologique du fumier de porcs

6.1. Les objectifs et la stratégie

A notre connaissance, aucun travail de caractérisation microbiologique des déchets d'élevage porcin sur litière (producteurs de fumier) n'a été réalisé à ce jour à l'aide d'outils moléculaires d'identification microbienne.

L'objectif général de ce travail était donc de caractériser la structure de la communauté microbienne des différents types de fumiers de porcs pour tenter de comprendre leur évolution microbiologique et comparer leurs rejets avec ceux des élevages producteurs de lisier.

La stratégie utilisée fut la même que pour la caractérisation du lisier :

- 1) Analyser les principaux paramètres physico-chimiques contenus dans les fumiers de paille et les fumiers de sciure.
- 2) Faire l'inventaire moléculaire des procaryotes des différents fumiers de porc par la réalisation de banques d'ADNr 16S.
- 3) Etablir les emplacements phylogénétiques des séquences *Bacteria* et *Archaea* obtenues.
- 4) Elucider les interactions possibles entre les composants biotiques et abiotiques de l'écosystème pour tenter de comprendre son fonctionnement, en utilisant les connaissances dérivées des analyses physico-chimiques et de l'inventaire moléculaire.

Pour cette étude, un fumier de porcs sur paille (FPP) et un sur sciure (FPS) ont été choisis pour développer **l'approche descriptive** qui correspond aux analyses des paramètres physico-chimiques. Pour l'analyse phylogénétique, les communautés microbiennes de 2 fumiers de porcs sur paille et 2 sur sciure ont été utilisées.

L'approche explicative pour corrélérer la structure de la communauté microbienne et les conditions physico-chimiques pour établir le fonctionnement possible des populations au sein de l'écosystème a été faite en utilisant tous les fumiers comme un seul écosystème.

6.2. Résultats et discussion

6.2.1. Les conditions physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques des fumiers sur paille et sur sciure sont résumés dans le **Tableau 6.1**. Les deux fumiers contiennent une quantité très similaire de matière sèche autour de 900 g/Kg MS. Ces valeurs sont très fortes (90 %) et ne correspondent pas aux valeurs habituellement observées pour ces types de fumiers qui sont entre 28 et 32 %. Il est probable qu'il y a eu un biais sur cette analyse provoqué par une perte d'humidité de l'échantillon pendant son transport. Les valeurs de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) des fractions totales pour les deux fumiers sont assez élevées car les fèces et les supports (paille et sciure) contiennent une grande quantité de matière carbonée. Cependant, leurs concentrations en DCO solubles varient d'un facteur 2,5 environ. Elles représentent 26 et 10 % de la DCO totale pour le FPP et le FPS, respectivement. Cette différence suggère que le FPP contient une quantité plus importante de matière organique, probablement formée par des fibres comme la cellulose (**Tableau 6.1**).

La composition physico-chimique des fumiers diffère de façon importante de celle du lisier pour la production de certains composés :

- Les conditions environnementales aérobies des fumiers ne favorisent pas la production d'**AGV**. Leur concentration dans les FPP et les FPS sont de $2 \pm 0,3$ et $0,323 \pm 0,3$ g/L respectivement avec 80 et 57 % des AGV sous la forme d'**acétate** (**Tableau 6.1**). Même si ces concentrations en acétate dépassent les valeurs permettant le bon fonctionnement de la digestion anaérobie (0,06 à 0,6 g/L), elles restent dans la limite des phénomènes d'inhibition supposés pour les procédés de digestion anaérobie. Ces faibles concentrations en AGV font du fumier un déchet avec des contraintes environnementales moindres par rapport aux problèmes d'odeur.

- **L'azote Total Kjeldahl (NTK)**, qui était à une très forte concentration dans le lisier de porcs, reste présent à de fortes concentrations dans les fractions totales et solubles du FPP et à une concentration plus faible dans le FPS. Par contre, les concentrations en azote ammoniacal, qui représentaient plus de 75 % du NTK dans le lisier, sont beaucoup plus faibles dans les fumiers. Elles s'élèvent à 23,5 et 17 % des fractions totales et solubles du FPP, respectivement ; et à seulement 2,7 et 5 % des fractions totales et solubles du FPS, respectivement. L'azote ammoniacal est pratiquement absent des FPS.

Tableau 6.1. Analyses physico-chimiques des fumiers sur paille et sur sciure.

Paramètre (g/L sauf MS et DCO)	FPP	FPS
Matière sèche (g/Kg)	867,3 ± 5,8	961,2 ± 4,4
Demande chimique en oxygène totale (g O₂/L)	102 ± 24	136 ± 17
Demande chimique en oxygène soluble (g O₂/L)	26,5 ± 4,6	14,2 ± 2,1
Azote Total Kjeldahl (fraction totale)	5,1 ± 0,58	2,7 ± 0,21
Azote ammoniacal (fraction totale)	1,2 ± 0,16	0,075 ± 0,032
Azote Total Kjeldahl (fraction soluble)	2,2 ± 0,06	1,5 ± 0,085
Azote ammoniacal (fraction soluble)	0,373 ± 0,116	0,075 ± 0,065
Acides gras volatils :	2 ± 0,3	0,323 ± 0,3
Acétate	1,6 ± 0,23	0,183 ± 0,32
Propionate	0,3 ± 0,26	0,11 ± 0,01
Butyrate	0,1 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Isobutyrate	0	0
Isovalérate	0	0
Anions :		
Nitrite	0	0
Nitrate	0,370 ± 0,06	1,87 ± 0,121
Sulfate	4,7 ± 0,18	2,1 ± 0,142

- Une partie de la quantité d'azote ammoniacal qui manque dans les deux fumiers est retrouvée sous la forme de nitrate. Dans le FPP, la concentration en nitrate est presque identique à celle de l'azote ammoniacal dans la fraction soluble. Concernant le FPS, elle dépasse non seulement la concentration en azote ammoniacal, mais aussi celle du NTK de la fraction soluble. Ce résultat indique une importante activité nitrifiante, surtout dans le FPS, qui a été confortée par la présence d'une très grande diversité de bactéries nitrifiantes du groupe

Proteobacteria dans l'inventaire de la communauté microbienne (**voir ci-dessous : 6.2.3.6**).

- A l'opposé du lisier où il n'y avait pas de sulfate, une quantité très importante de cet anion a été trouvée dans les fractions solubles des deux fumiers. Normalement, le sulfate est métabolisé en sulfure d'hydrogène en conditions anaérobies par les bactéries sulfato-réductrices. Les conditions aérobies des fumiers ont probablement empêché cette transformation qui requiert un potentiel redox très bas, autour de -220 mV (Payne, 2001).

6.2.2. Inventaire moléculaire de la communauté microbienne des fumiers de porcs et placement phylogénétique des espèces

L'inventaire moléculaire des communautés microbiennes *Bacteria* et *Archaea* des fumiers porcins a été fait par extraction de l'ADN total des différents fumiers de paille et de sciure. Les gènes codant pour les ARN ribosomiques 16S (ADNr 16S) ont été amplifiés et clonés. Les inventaires ont été produits à partir de neuf clonages indépendants qui ont eu un pourcentage d'efficacité de clonage entre 70 et 77 % pour chaque domaine (**voir Tableau 4.6 en M&Ms**). Le séquençage des clones bactériens a été réalisé au Génoscope d'Evry sans tri préalable des clones par RFLP. En revanche, le séquençage pour l'inventaire des *Archaea* a été effectué au laboratoire après avoir préalablement classé les clones par RFLP.

Les séquences partielles d'ADNr d'environ 500 pb ont été réalisées pour un total de 228 bactéries et 72 *Archaea*. L'analyse phylogénétique de ces séquences a permis de les classer en 153 phylotypes *Bacteria* et 14 phylotypes *Archaea* (**Tableau 6.2**). Cette analyse a montré encore une fois une très grande diversité de bactéries contre une faible diversité d'*Archaea*. D'autre part, trois séquences *Bacteria* et une séquence *Archaea* se sont révélées être des chimères. Elles ont été exclues de l'analyse.

Une plus grande diversité de phylotypes *Archaea* a été révélée dans les fumiers par rapport au lisier, même si tous ces phylotypes ont été proches de séquences connues originaires de tubes digestifs animaux ou de lisier de porcs. De même, les phylotypes bactériens ont été affiliés à des séquences d'origines beaucoup plus diverses que celles du lisier (**Tableau 6.3**).

Tableau 6.2. Affiliation phylogénétique des séquences *Bacteria* et *Archaea* trouvées dans l'inventaire moléculaire des fumiers porcins.

Groupe Phylogénétique ^a	Phylotypes	Nombre de clones	Similarité moyenne (%) ^b
BACTERIA			
Bactéries Gram positives à Bas GC %			
<i>Eubacterium</i> et apparentées	9	9	89
<i>Clostridium</i> et apparentées	10	22	93
<i>Clostridium purinolyticum</i> groupe	4	5	90
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> subdivision	16	23	94
<i>Mycoplasma</i> et apparentées	15	20	86
<i>Flexibacter-Cytophaga- Bacteroides</i> groupe	29	51	87
<i>Proteobacteria</i>	21	30	90
Minor Phyla			
Spirochaetes et apparentées	1	3	n.a.
<i>Flexistipes sinusarabici</i> assemblage	1	1	n.a.
<i>Fibrobacter</i> groupe	1	1	n.a.
Non affiliés			
Cluster A	11	13	n.a.
Cluster B	18	23	n.a.
Cluster C	7	12	n.a.
Autres	10	12	n.a.
TOTAL	153	225	
ARCHAEA			
<i>Euryarchaeota</i>			
CA11 et relatives	6	26	96
<i>Methanobacteriales</i>	5	9	98
<i>Methanomicrobiales</i>	2	5	92
<i>Methanosarcinales</i>	1	31	n.a.
TOTAL	14	71	

a. Le groupe phylogénétique correspond au Ribosomal Data Base Project II (RDP-II).

b. La similarité moyenne correspond à la moyenne de la similarité de chaque phylotype par rapport à leur séquence la plus proche trouvée dans les bases de données.

c. La similarité moyenne n'a pas été calculée car il n'y a qu'un seul phylotype.

n.a. = non applicable.

Les séquences originaires du sol (17 % des phylotypes bactériens), de sédiments et de boues (12 % de phylotypes), ainsi que celles originaires d'écosystèmes divers (34 % de phylotypes) ont été les plus nombreuses (63 % des phylotypes). Seulement 31,5 % des phylotypes bactériens (représentant 18,8 % des séquences bactériennes) ont été apparentés à des séquences originaires de tubes digestifs animaux, du rumen, d'excréments ou de lisier, dont environ 7,5 % avec plus de 97 % de similarité. Quelques phylotypes proches de séquences du tube digestif porcin ont été observés,

mais la plupart ont été proches de phylotypes de l'intestin humain. Les phylotypes proches de séquences du rumen ont représenté 5,5 % (3,5 % des séquences) du total.

Tableau 6.3. Origine et similarité des séquences apparentées aux phylotypes *Bacteria* des fumiers ^a.

	Différentes niches des séquences apparentées						
	Tractus intestinal des animaux	Fèces	Déjections animales	Rumen	Sol	Sédiments et boues	Autres
BACTERIA							
Micro-organismes cultivés							
similarité supérieure à 97 %	3	1	0	0	0	3	2
similarité inférieure à 97 %	11	5	0	3	18	10	27
Micro-organismes non cultivés							
similarité supérieure à 97 %	1 ^b	0	3	0	0	0	0
similarité inférieure à 97 %	2 ^b	0	9	3	0	0	6
Total des phylotypes	17	6	12	6	18	13	35
Pourcentage des séquences	10,3	3	5,5	3,5	11	10,3	56,4

a. L'analyse n'a porté que sur 107 phylotypes et 165 séquences car les groupes non affiliés ont été exclus.

b. Toutes les séquences apparentées proviennent du tractus gastro-intestinal de porc (Leser *et al.*, 2002).

6.2.3. Diversité et abondance bactérienne

L'analyse moléculaire des 228 séquences d'ADNr 16S du domaine *Bacteria* a détecté 153 phylotypes. La plupart ont été affiliés aux bactéries Gram positives à bas GC %, aux *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* et aux Proteobacteria. 46 phylotypes forment des groupes non affiliés (voir Annexes : Tableau a6.1).

Seulement 15 phylotypes ont eu une similarité de séquence supérieure à 97 % par rapport aux séquences connues disponibles dans les bases de données. Parmi eux, 4 sont liés à des phylotypes du lisier et 9 à des espèces cultivées (voir Annexes : Tableau a6.1). Cinq de ces derniers appartiennent à la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*. D'autre part, tous les phylotypes des groupes *Clostridium purinolyticum*, *Mycoplasma* et apparentés, et *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* (CFB) ont eu une similitude faible ou modérée avec des séquences d'espèces cultivées. Le groupe CFB est numériquement le plus abondant de l'inventaire et

contient 23 % des séquences analysées.

Les phylotypes les plus nombreux contiennent 12 séquences (PILAJG11), 9 séquences (PILAJH12) et 5 séquences (PILALG12, PILAME04 et PILANA03). Ces phylotypes sont proches, respectivement, du clone p-406-o3 du tractus digestif porcin (AF371835) appartenant au groupe *C. botulinum*, de *Bacteroides forsythus* (X73962), de *Streptococcus alactolyticus* (AF201899), de *Flavobacterium breve* (M59052) tandis que le dernier appartient à un groupe non affilié (cluster C). Les autres phylotypes contiennent trois séquences ou moins et 114 phylotypes sont formés par une séquence unique.

La comparaison entre les inventaires de lisier et de fumier de porcs montre une importante différence de populations anaérobies typiques d'environnements intestinaux animaux. Deux des groupes les plus divers et abondants du lisier (*C. coccoïdes* et *C. leptum*) ont pratiquement disparu dans le fumier où les groupes de bactéries les plus divers et abondants sont affiliés aux bactéries Gram positives à bas GC % (subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* et *Mycoplasma* et apparentés), aux groupes CFB et Proteobacteria. Ce dernier, qui représente seulement 4 et 2 % de la diversité et de l'abondance de la communauté du lisier, respectivement, augmente à 14 et 13 % dans le fumier. 66 % des phylotypes affiliés aux Proteobacteria sont groupés avec des séquences connues de bactéries nitrifiantes ou dénitrifiantes. Une différence importante entre les deux écosystèmes est le nombre important de phylotypes non affiliés dans le fumier qui s'élève à 30 % des phylotypes et 27 % des séquences, respectivement.

6.2.3.1. *Eubacterium* et apparentés

Ce groupe bactérien est l'un des moins abondants et divers trouvé dans l'inventaire du fumier (**Tableau a6.1**). Il est représenté par 9 phylotypes, soit 4 % des séquences bactériennes. Tous les phylotypes n'ont qu'une séquence. La similarité moyenne entre les phylotypes de ce groupe et leurs séquences les plus proches est de 89 %. Seulement la moitié des phylotypes ont des valeurs de bootstrap supérieures à 50 %. La majorité des phylotypes appartient aux groupes *Eubacterium* et *Clostridium lituseburense*. Seulement un phylotype (PILAIH08) est affilié au sous-groupe *Clostridium coccoïdes*. Ce phylotype est proche de *Clostridium phytofermentans* qui était un des phylotypes les plus abondants de l'inventaire du lisier.

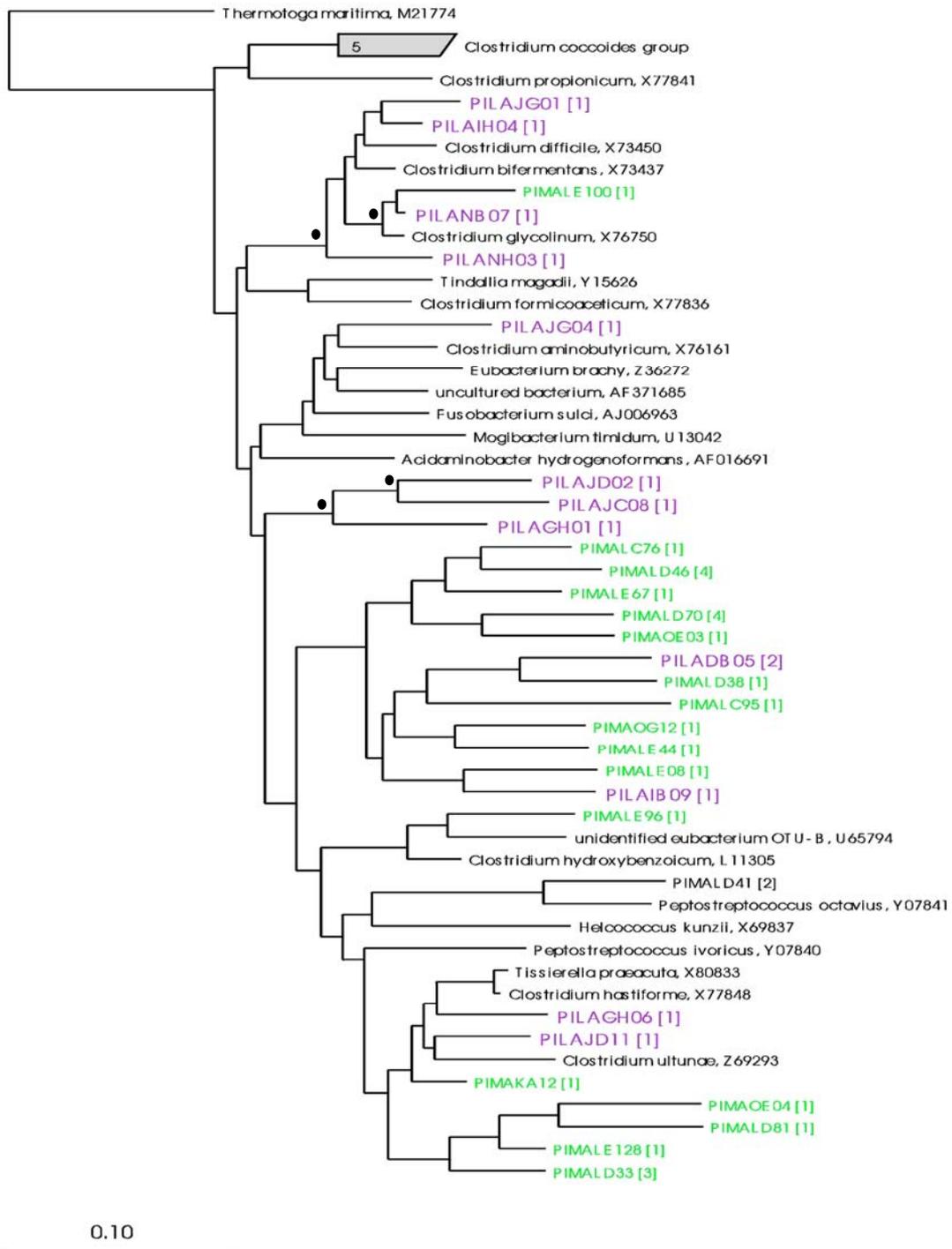


Figure 6.1. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Eubacterium* et apparentées. La couleur violette correspond aux phylotypes du fumier et la verte aux phylotypes du lisier. Le nombre de clones pour chaque phylotype est indiqué entre parenthèses. L'arbre consensus a été calculé par la méthode des distances en utilisant les algorithmes de neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987) et la correction de Jukes-Cantor (Jukes et Cantor, 1969). Le point noir sur les nœuds des branches indique un pourcentage

Seul un phylotype de ce groupe a une similitude de séquence supérieure à 97 % avec des séquences connues des bases de données. Il s'agit de PILANB07 qui a été identifié comme *Clostridium glycolicum*, isolé de boue. Les autres phylotypes sont liés à des séquences ou des micro-organismes isolés de boues, de sédiments ou de sol. L'analyse phylogénétique des phylotypes montre le regroupement de deux phylotypes du fumier (PILADB05 et PILAIB09) avec 10 phylotypes de lisier différents¹.

6.2.3.2. *Clostridium* et apparentés

Quatorze phylotypes ont été affiliés aux **groupes *Clostridium***. Quatre d'entre eux appartiennent au groupe *C. purinolyticum* et contiennent environ 2 % des séquences *Bacteria* analysées. Ils ne sont fortement liés avec aucune séquence connue (**Tableau 6.3**). Les 10 autres phylotypes *Clostridium* (10 % des séquences *Bacteria*) se répartissent entre les sous-groupes *C. botulinum* et *C. leptum* (Tableau 6.3). Ils présentent une similarité moyenne de 93 % et un bootstrap supérieur à 50 % à l'exception du phylotype PILAIC12. Une observation frappante est la presque disparition du sous-groupe *C. leptum* qui a seulement 2 phylotypes (PILAFH06 et PILAJB04) alors qu'il était très représenté dans l'inventaire du lisier.

Dans le sous-groupe *C. botulinum* se trouve le phylotype le plus nombreux de l'inventaire avec 12 séquences. Il est fortement lié à un clone du tractus digestif porcin. Deux autres phylotypes, PILAIG12 et PILAMB02 sont aussi proches de phylotypes du lisier. Un troisième phylotype a été identifié comme *Clostridium carnis* isolé de viande contaminée (Fig. 5.2). À l'exception du phylotype PILAIB11, tous les autres phylotypes sont liés à *Clostridium thermocellum* (L09173) isolé de la boue d'un réacteur d'épuration.

Dans la **Figure 6.2**, on observe que deux phylotypes du fumier (PILAGB06 et PILAIG12) se sont groupés avec 5 phylotypes de lisier autour d'une autre séquence de lisier de fosse de stockage de la littérature.

¹ Les phylotypes nommés PIMAK et PIMAO ont été obtenus de l'inventaire d'un lisier originaire d'une porcherie INRA de St. Gilles.

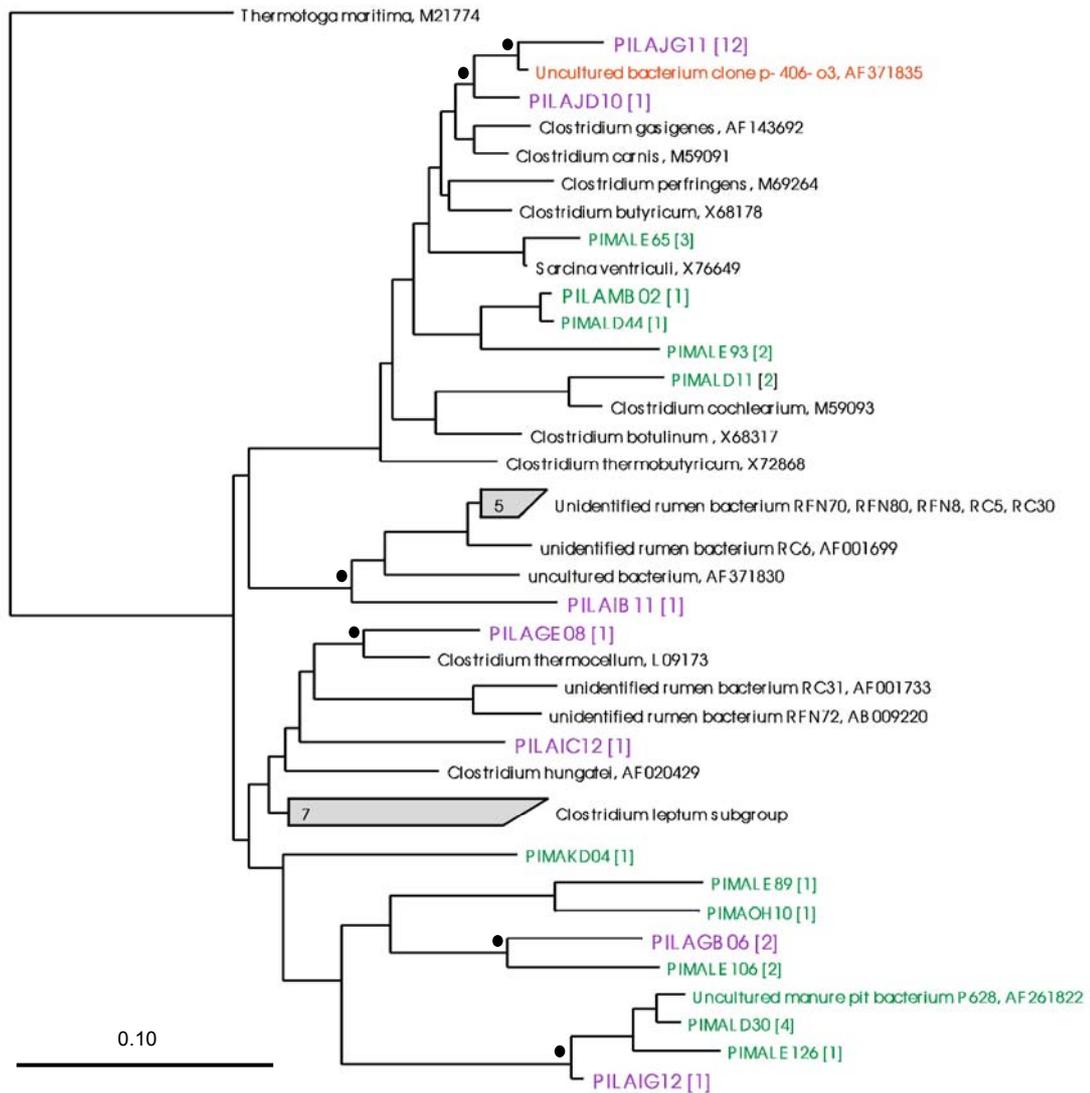


Figure 6.2. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Clostridium* et apparentées. La couleur rouge correspondre aux phylotypes de l'intestin du porc (Leser *et al.*, 2002). Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1.

6.2.3.3. Subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*

Les 16 phylotypes (10 % des séquences bactériennes) affiliés à ce groupe ont une similarité moyenne de 94 % et des valeurs de bootstrap supérieures à 50 % pour la plupart des séquences (**Fig. 6.3**). Comme dans l'inventaire de lisier, c'est le score d'identification le plus élevé observé parmi tous les groupes analysés et il détient aussi le record de similitude avec des micro-organismes cultivés puisque cinq phylotypes

sont proches, à plus de 97 %, de micro-organismes cultivés (**Tableau. 6.2**).

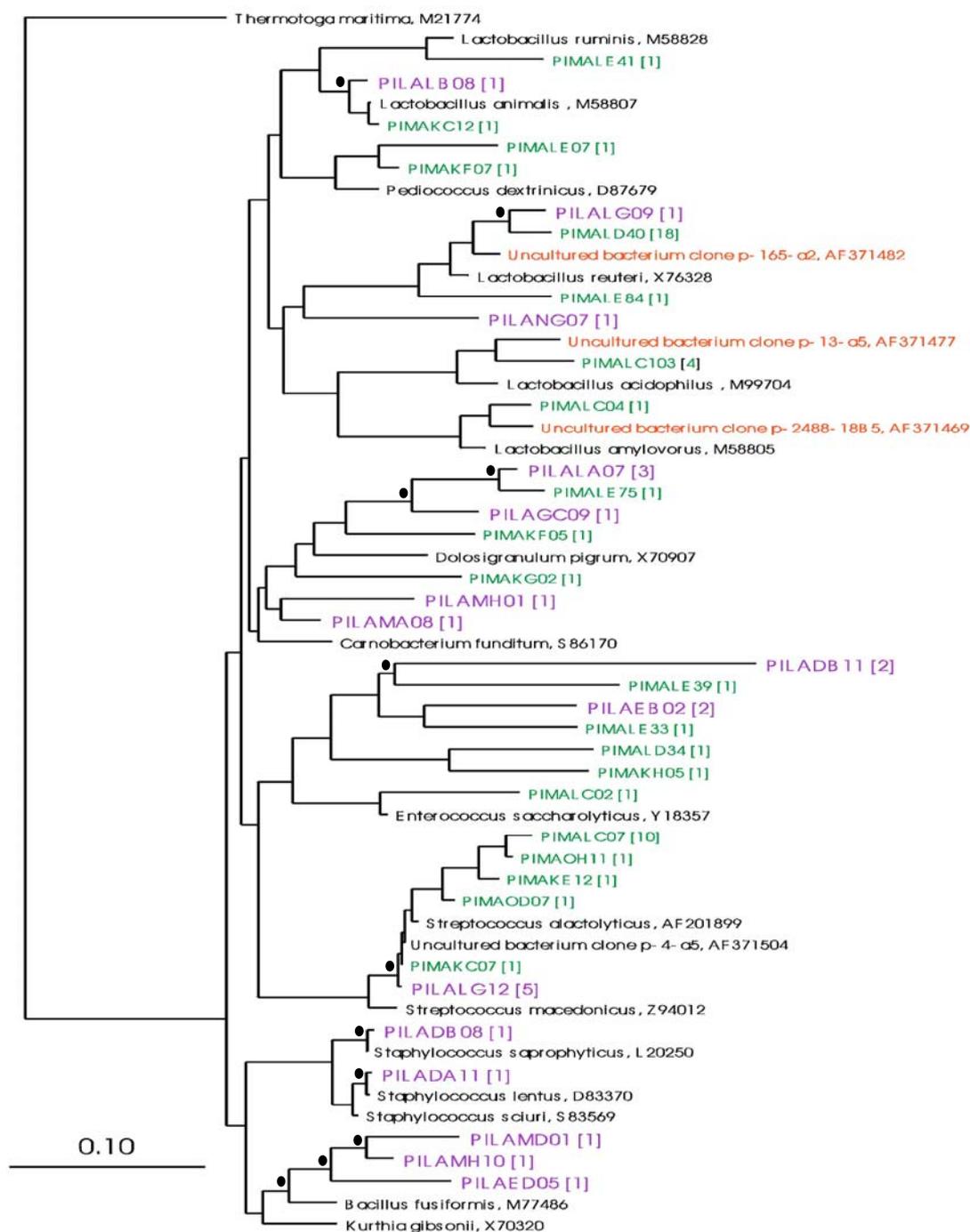


Figure 6.3. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées à la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1 et 6.2.

Ce groupe est le plus représenté de l'inventaire parmi les Gram positives à bas GC %. Il contient l'un des phylotypes les plus nombreux de l'inventaire (PILALG12) qui a été identifié comme *Streptococcus alactolyticus*. Les séquences liées à cette bactérie ont été très abondantes dans les inventaires du lisier et du tractus digestif porcin, nous l'avons choisie comme indicateur de contamination fécale de porc pour le développement du système de détection par PCR en temps réel (**voir Chapitre 7**). En revanche, dans le groupe des Lactobacilli, seulement deux phylotypes sont liés à *Lactobacillus reuteri* alors que ce micro-organisme était dominant dans les inventaires de lisier et du tractus digestif porcin.

Le groupe *Carnobacterium* est représenté par 4 phylotypes, l'un d'eux (PILALA07) est très proche du phylotype PIMALE75 du lisier. Les trois autres ne sont que faiblement liés à *Carnobacterium funditum* et *Dolosigranulum pigrum* isolés d'une eau anoxique et d'une patiente septicémique, respectivement. D'autre part, le groupe *Enterococcus* contient deux phylotypes avec deux clones liés à *E. saccharolyticus* isolé de l'intestin humain.

Dans cet inventaire, des phylotypes affiliés au groupe *Staphylococcus* (PILADB08 et PILADA11) ont été identifiés comme *S. saprophyticus* et *S. lentus* isolés de la flore intestinale de l'homme et du tractus respiratoire infecté d'animaux, respectivement. Finalement, le sous-groupe *Bacillus sphaericus* a été représenté par trois phylotypes liés à *B. fusiformis* isolé du sol.

L'arbre phylogénétique met en évidence trois groupes isolés. Le premier s'est formé autour de *Dolosigranulum pigrum* par 4 phylotypes du fumier et 3 phylotypes de lisiers. Le second est formé par 2 phylotypes du fumier et 4 phylotypes de lisiers autour de *Enterococcus saccharolyticus*. Le troisième regroupe un phylotype du fumier, 5 phylotypes de lisiers et un clone du tractus digestif porcin autour de *S. alactolyticus*.

6.2.3.4. *Mycoplasma* et apparentés

Les quinze phylotypes (9 % des séquences bactériennes) affiliés à ce groupe phylogénétique présentent un positionnement phylogénétique incertain avec une faible similarité moyenne (86 %) par rapport aux séquences des bases de données et des valeurs de bootstrap inférieures à 50 % pour la majorité des phylotypes (**Figure 6.4**).

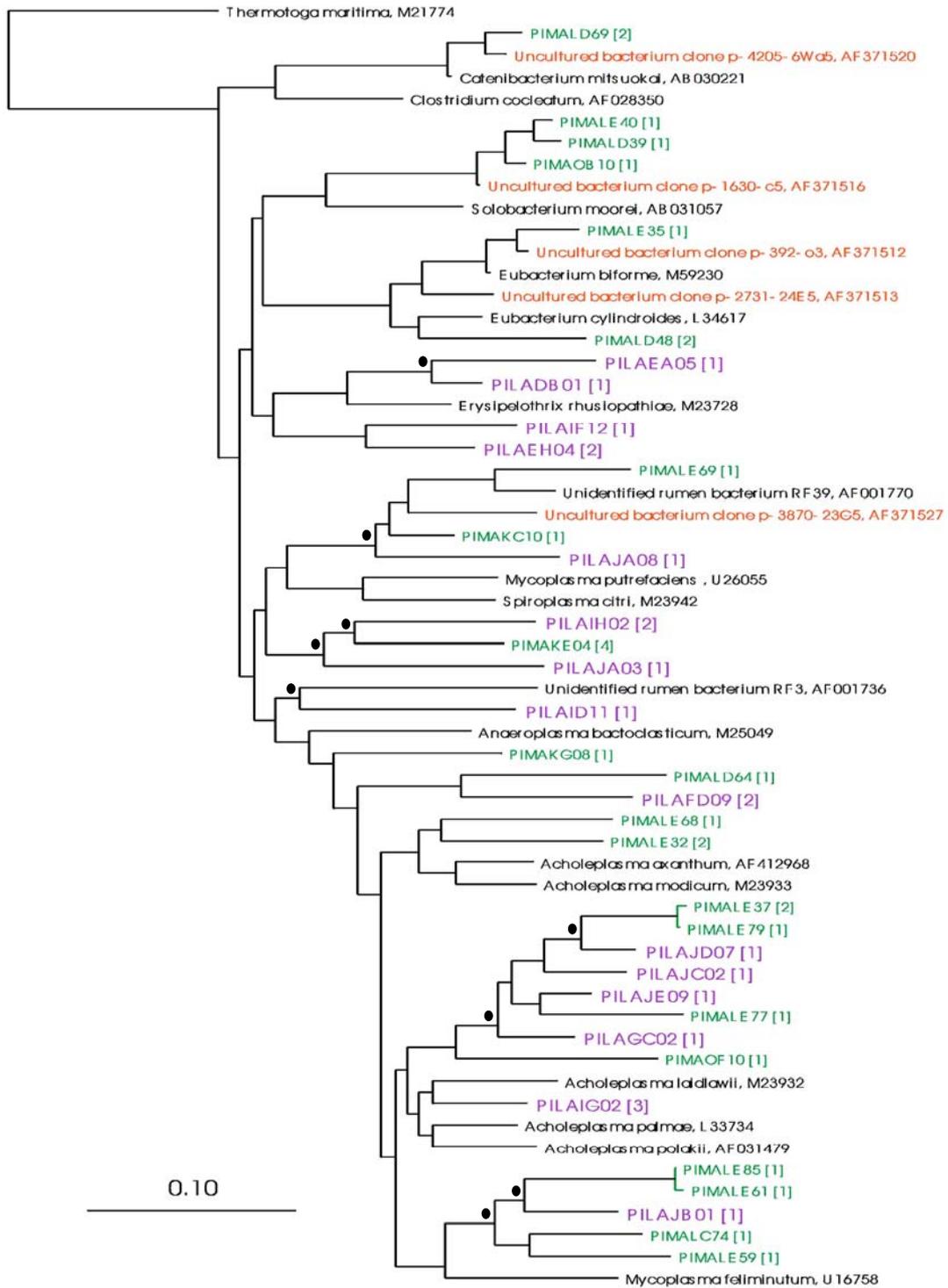


Figure 6.4. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe *Mycoplasmas* et apparentées. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1 et 6.2.

Presque tous les phylotypes de ce groupe sont affiliés au sous-groupe *Acholeplasma-Anaeroplasma* sauf trois, PILAIH02, PILAJA03 et PILAJA08 qui appartiennent au sous-groupe *Spiroplasma*.

Aucun phylotype n'est proche à plus de 97 % d'une séquence déjà connue et seulement trois (PILAFD09, PILAID11 et PILAJA08) sont liés à des séquences isolées de systèmes digestifs comme le rumen et le tractus digestif porcin (**Tableau 6.2**).

Les autres phylotypes du sous-groupe *Acholeplasma-Anaeroplasma* sont tous faiblement apparentés aux espèces cultivées : *Anaeroplasma bactoclasticum*, *Mycoplasma feliminutum*, *Acholeplasma palmae* et *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Cette dernière est la cause d'une maladie très connue dans le monde car elle attaque les jeunes porcs (Burton et Turner, 2003). Les phylotypes liés à ces deux dernières espèces représentent la moitié de la diversité des *Mycoplasma* et apparentés.

Il est important de souligner que ce groupe est resté avec une diversité et une abondance proche de celle du lisier. Cet aspect est important à considérer pour la recherche des groupes microbiens à choisir comme indicateurs de contamination de lisier et de fumier de porcs.

6.2.3.5. Groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*

Ce groupe phylogénétique a augmenté en diversité et en abondance par rapport au tractus digestif porcin et au lisier. Ses vingt-neuf phylotypes (23 % des séquences bactériennes) ont une faible similarité moyenne de 87 % mais un bootstrap supérieur à 50 % pour la majorité des séquences par rapport à leurs plus proches relatifs (**Fig. 6.5a et b**).

Le groupe *Cytophaga I* est surtout représenté par des phylotypes faiblement liés à *E. brevis* isolé de l'intestin humain. D'autre part, trois phylotypes (PILAIH09, PILAJA05 et PILAJA07) appartiennent au groupe *Cytophaga aurantiaca* et sont proches d'un clone isolé d'une aquifère contaminée par des hydrocarbures.

La **Figure 6.5a** montre la présence d'un groupe contenant 10 phylotypes de fumier, deux phylotypes de lisiers et les bactéries *E. brevis* et *Chryseobacterium indologenes*.

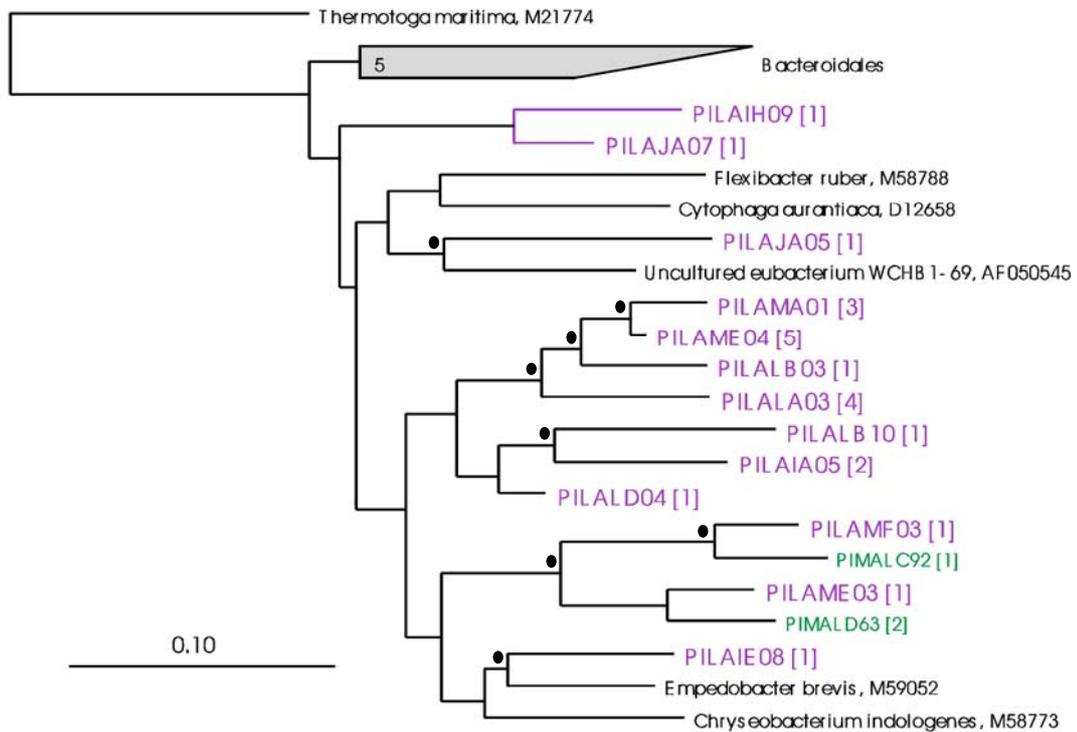


Figure 6.5 (a). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S du sous-groupe *Cytophaga* I et du groupe *Cytophaga aurantiaca* affiliées au groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1.

Dans le groupe *Bacteroides* (Figure 6.5b), cinq phylotypes du sous-groupe *P. macacae* sont proches de phylotypes du lisier, quatre d'entre eux sont liés à PIMALC193. Le second phylotype numériquement plus abondant de l'inventaire (PILAJH12, 9 séquences) groupe avec *Bacteroides forsythus* isolé de poches périodontales humaines.

La Figure 6.5b montre l'existence de deux groupes qui réunissent : pour le premier, 8 phylotypes de fumier et 4 phylotypes de lisiers autour de *Bacteroides* sp. ; pour le second, 3 phylotypes de fumier et 15 phylotypes de lisiers.

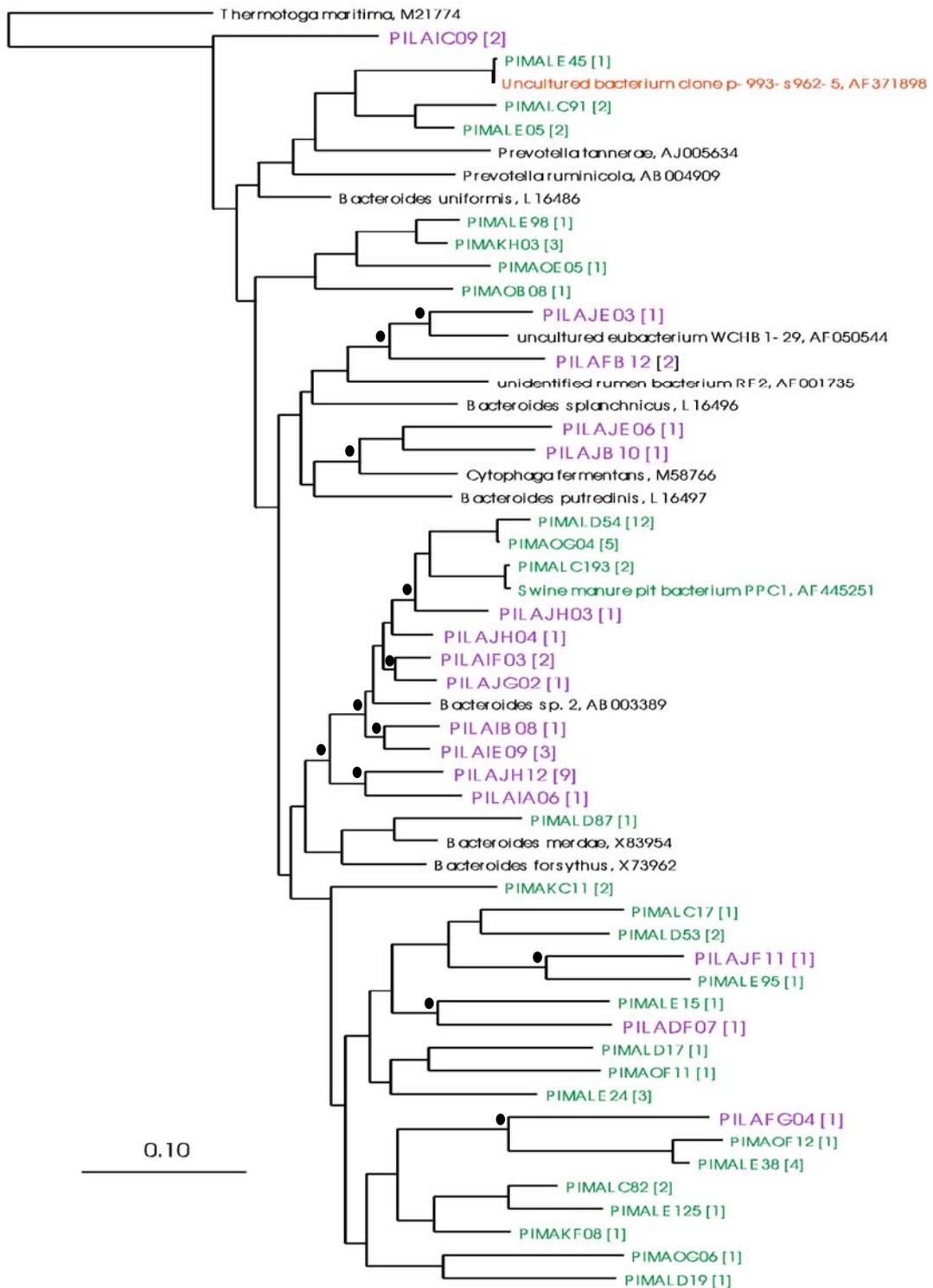
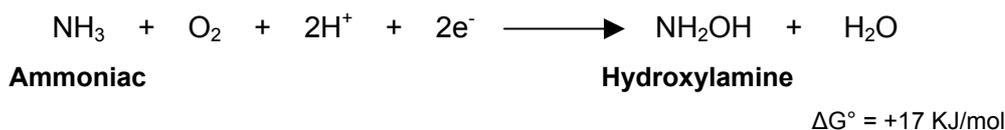


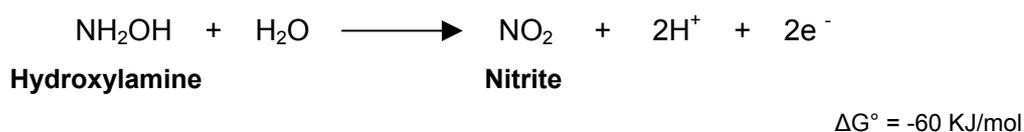
Figure 6.5 (b). Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S du sous-groupe *Bacteroides* affiliées au groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1 et 6.2.

6.2.3.6. *Proteobacteria*

Vingt et un phylotypes (13 % des séquences bactériennes) ont été affiliés à ce groupe avec une similarité moyenne de 89 %. Treize appartiennent à la sous-division *gamma*, la plupart sont faiblement liés aux séquences de bactéries nitrifiantes typiques du sol comme *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida*. 4 phylotypes sont affiliés à la sous-division *beta*. PILAJG10 et PILAMH11 ont été identifiés comme *Thauera aromatica* et *Denitrobacter permanens* (97 % de similarité et bootstrap de 99 %), tous les deux ont été isolés des boues d'un réacteur biologique dénitrifiant. Les 2 autres phylotypes sont très proches de *Nitrosomonas europea* (PILANB10) et *Rhodocyclus tenuis* (PILAGC10), deux bactéries nitrifiantes isolées de réacteurs d'épuration (**Figure 6.6**). Cette diversité de séquences affiliées aux bactéries nitrifiantes explique la faible concentration en azote ammoniacal rencontrée dans les fumiers. Ces micro-organismes utilisent l'ammoniac comme substrat selon la réaction suivante (Prosser, 1989) :



Cette réaction endergonique est menée par l'enzyme ammonia mono-oxygénase. Ensuite, l'hydroxylamine est oxydée en nitrite par l'enzyme hydroxylamine oxidoréductase selon la réaction suivante :



Parmi les bactéries nitrifiantes qui font l'oxydation de l'ammoniac jusqu'au nitrite, on trouve *Nitrosomonas europea*. Finalement, le nitrite est oxydé en nitrate par l'enzyme nitrite oxidoréductase selon la réaction suivante :



Cette réaction, qui peut être réalisée par des bactéries nitrifiantes hétérotrophes comme *Pseudomonas spp* (Killham, 1986), peut expliquer les fortes concentrations de nitrate observées dans les fumiers.

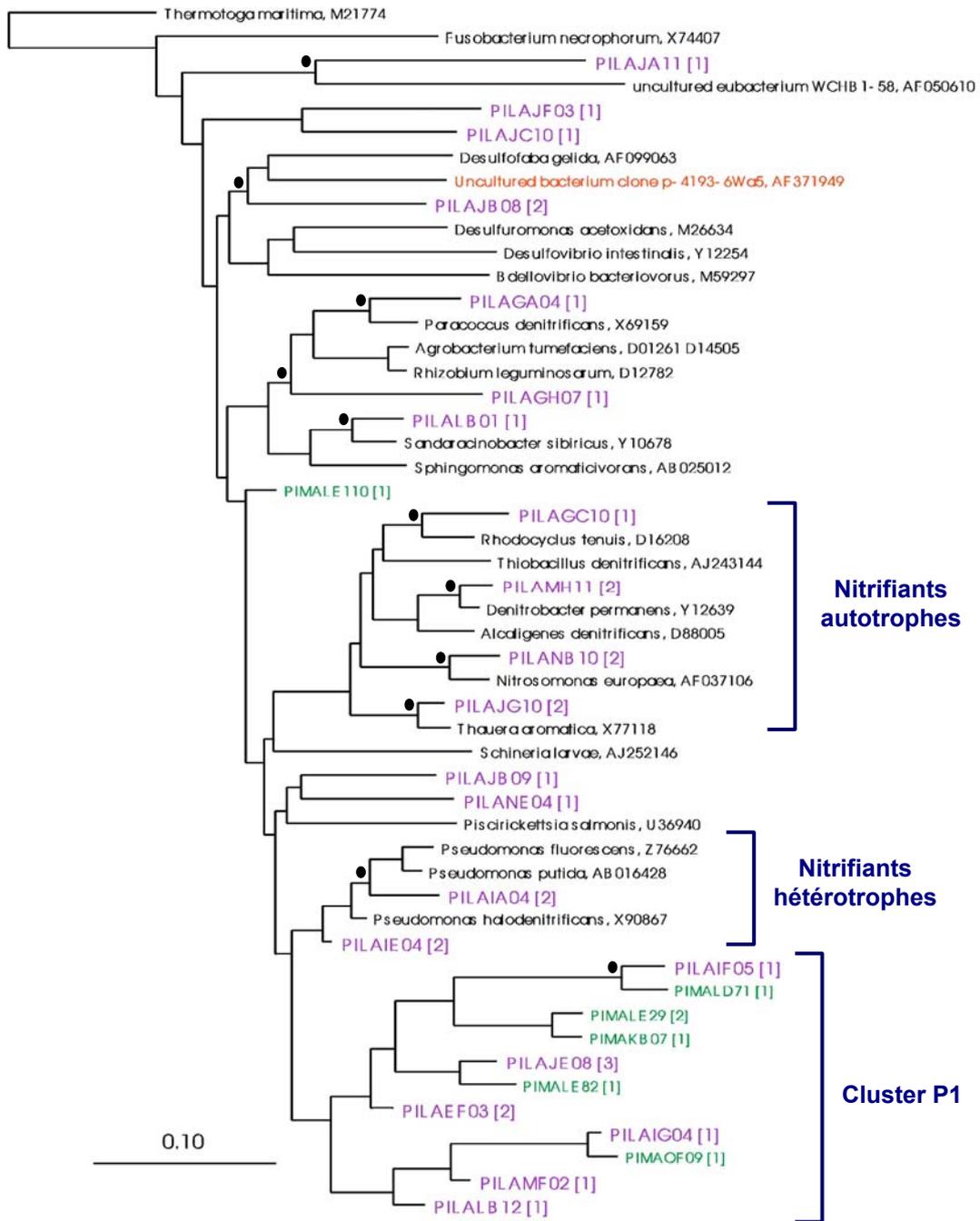


Figure 6.6. Emplacement phylogénétique des séquences d’ADNr 16S affiliées aux Proteobacteria. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1 et 6.2.

Les phylotypes affiliés à la sous-division *beta* se sont groupés avec des séquences de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes autotrophes tandis que les phylotypes affiliés à la sous-division *gamma* ont formé un grand cluster (P1) avec des séquences de bactéries

nitrifiantes hétérotrophes. Dans ce cluster, on distingue deux groupes de phylotypes, le premier est formé par trois séquences de fumier et 4 séquences de lisiers ; le second contient trois séquences de fumier et une séquence de lisier.

Trois phylotypes appartiennent à la sous-division *alpha*. PILAGA04 est proche d'un micro-organisme hétérotrophe dénitrifiant, *Paracoccus denitrificans* avec une similarité de 93 %. PILALB01 est proche de *Sandaracinobacter sibiricus* isolée du milieu marin. Finalement, PILAGH07 est faiblement lié à *Agrobacterium tumefaciens*.

Le dernier phylotype Proteobacteria (PILAJA11), qui appartient à la sous-division *delta*, est modérément lié au clone WCHB1-58 isolé d'une aquifère contaminée par des hydrocarbures.

6.2.3.7. Groupes phylogénétiques minoritaires

Un phylotype (PILAJA01) contenant trois séquences a été affilié aux Spirochètes et apparentés. Il est lié à une séquence nommée Wall less Spirochaeta sp. Le phylotype PILAJG03 est faiblement lié au clone du lisier PIMALC102 (91 % similarité). D'autre part, le phylotype PILAGB01 est faiblement lié à une séquence isolée de la boue d'un réacteur d'épuration (75 % de similarité). Il appartient à l'assemblage *Flexistipes sinusarabici* (RDP reg. no. 2.14).

6.2.3.8. Groupes non affiliés

Un grand nombre de phylotypes est resté non affilié (46 phylotypes - 60 séquences), la plupart sont groupés dans trois clusters (A, B et C). Le cluster A contient 7 % des phylotypes bactériens (6 % de séquences bactériennes). Le cluster B est formé par 12 % des phylotypes (10 % des séquences) (**Fig. 6.7**). Ces deux clusters semblent associés au groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*.

Le cluster C, qui regroupe 5 % des phylotypes (5 % de clones), semble associé à la sous division *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (**Fig. 6.7**). Les autres phylotypes non affiliés (7 %, 5 % des séquences) sont restés isolés.

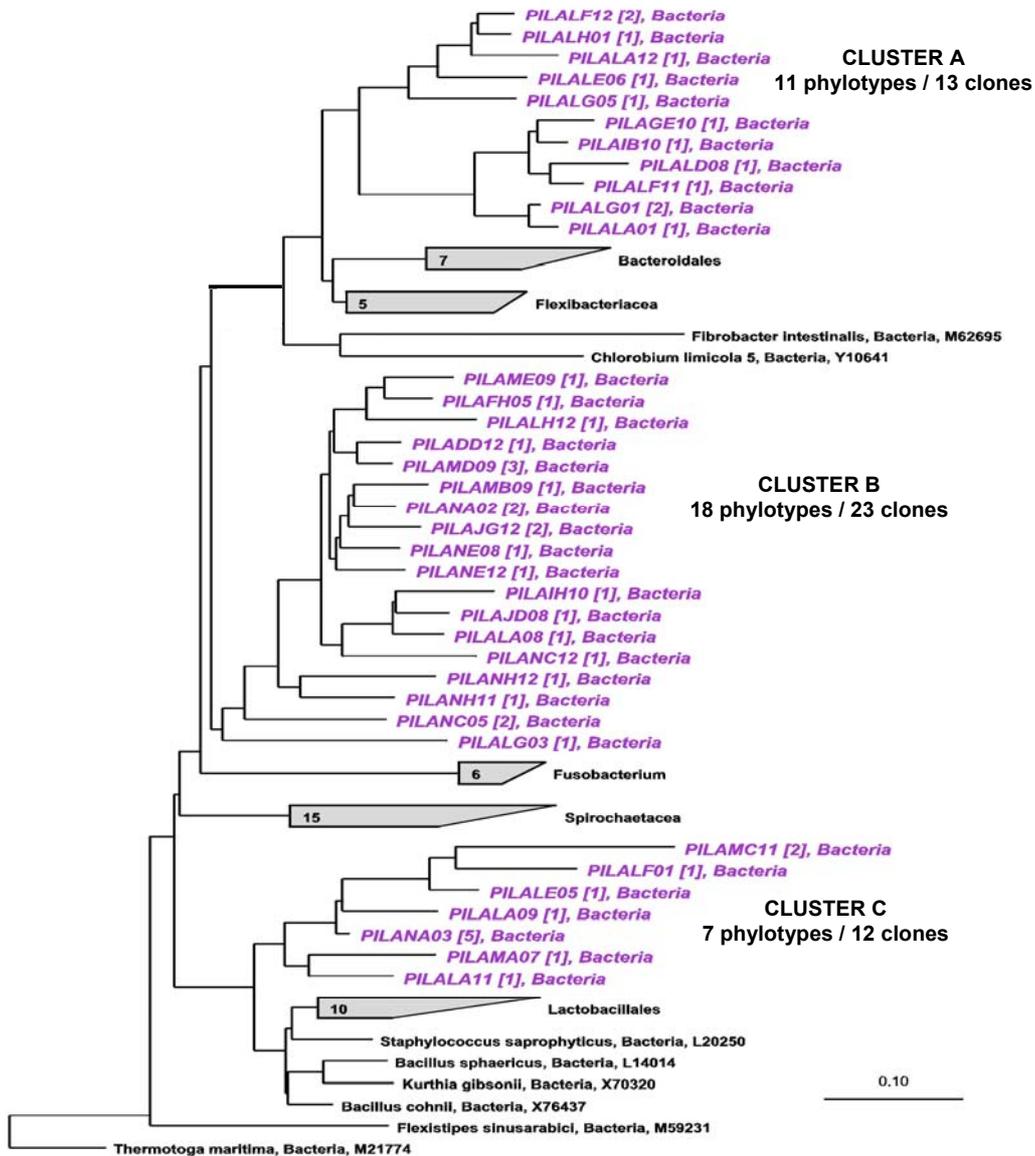


Figure 6.7. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S des groupes non affiliés qui ont formé les clusters A, B, et C. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1.

6.2.4. Diversité et abondance des *Archaea*

Les 71 clones d'ADNr 16S du domaine *Archaea* ont été obtenus par PCR nichée, ce qui suggère que leur abondance est très inférieure dans les fumiers par rapport au lisier. Le pourcentage d'efficacité de clonage a toujours été supérieur à 70 %. Après un tri préalable des clones par RFLP, 30 séquences ont été réalisées. Leur analyse

phylogénétique a révélé une diversité inférieure à celle des bactéries. Après le retrait d'une chimère, les séquences définissent 14 phylotypes qui sont presque tous liés à ceux observés précédemment dans le lisier (**Tableau 6.2**). Ces 14 phylotypes sont très proches (96 % de similarité moyenne) de séquences déjà connues originaires d'intestins d'animaux ou de lisier de porcs, avec des valeurs de bootstrap supérieures à 50 % même sur les branches principales des arbres phylogénétiques. Six d'entre eux s'intègrent dans le groupe monophylétique non cultivé **CA11** (**voir : 5.2.2.3.1**).

Les autres phylotypes appartiennent aux groupes des *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* et *Methanosarcinales*. Ce dernier groupe de méthanogènes acétotrophes n'est représenté que par un seul phylotype (PILDJ12) mais il contient 31 séquences. Dans le lisier, aucune séquence proche de méthanogènes acétotrophes n'avait été observée.

La présence d'une *Archaea* acétotrophe est une caractéristique qui correspond aux systèmes de digestion anaérobie comme les sédiments et les réacteurs d'épuration des eaux usées. Contrairement, aux systèmes digestifs animaux où les acétotrophes sont manquantes à cause de l'absorption des acides gras volatils par l'intestin des animaux.

6.2.4.1 Groupe *Archaea* non cultivées

Les six phylotypes de ce groupe (**Fig. 6.8**) sont affiliés au **groupe CA11** décrit auparavant. Les phylotypes les plus dominants (PILDG20, PILDK30 et PILG23), qui contiennent 12, 6 et 4 séquences respectivement, sont très proches des phylotypes PIMADF16 et PIMADF86 du lisier. Un autre phylotype (PILDK26) est aussi très proche de PIMADF53 (**voir Annexes ; Tableau a6.1**). Ils représentent 30 % des séquences *Archaea*. Les deux derniers phylotypes sont liés au clone Ar26 isolé du lisier de porcs d'une fosse de stockage (Whitehead et Cotta, 1999), et au clone P4b-Ar-25 originaire du tube digestif de termite.

On notera qu'à l'intérieur du groupe CA11, tous les phylotypes de lisier et de fumier de porcs sauf deux (PILDG23 et PILDG38) sont regroupés dans deux clusters que nous avons nommés PIMA86, PIMA53.

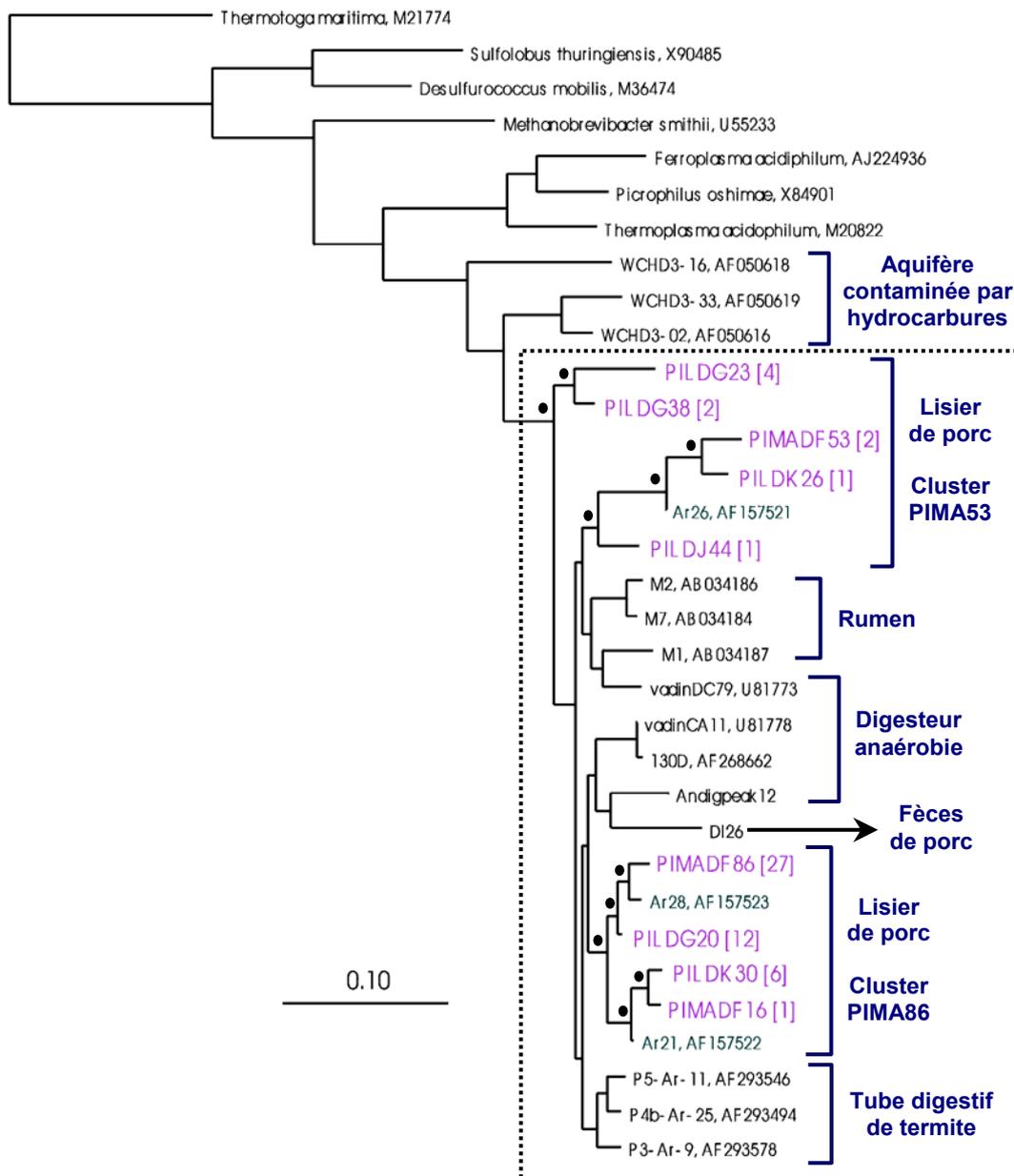


Figure 6.8. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées au groupe CA11 et apparentées. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1. Le carré en pointillé montre les séquences qui appartiennent au groupe CA11.

6.2.4.2. Groupes *Archaea* méthanogènes

Les sept phylotypes *Archaea* (31 % des séquences liées aux méthanogènes) affiliés aux groupes **méthanogènes hydrogénotrophes** sont proches de séquences de micro-organismes isolés de tube digestif d'animaux ou de lisier. Cinq d'entre eux (20 %

de séquences) appartiennent aux *Methanobacteriales* (Fig. 6.9). Tous ces phylotypes ont une similarité de 97 % ou plus avec leur séquence la plus proche (voir Annexes ; Tableau a6.1). Les phylotypes liés à *Methanobrevibacter smithii* (PILDH37 et PILDG16) sont dominants parmi les *Methanobacteriales* du fumier, comme c'était le cas dans le lisier et les environnements intestinaux.

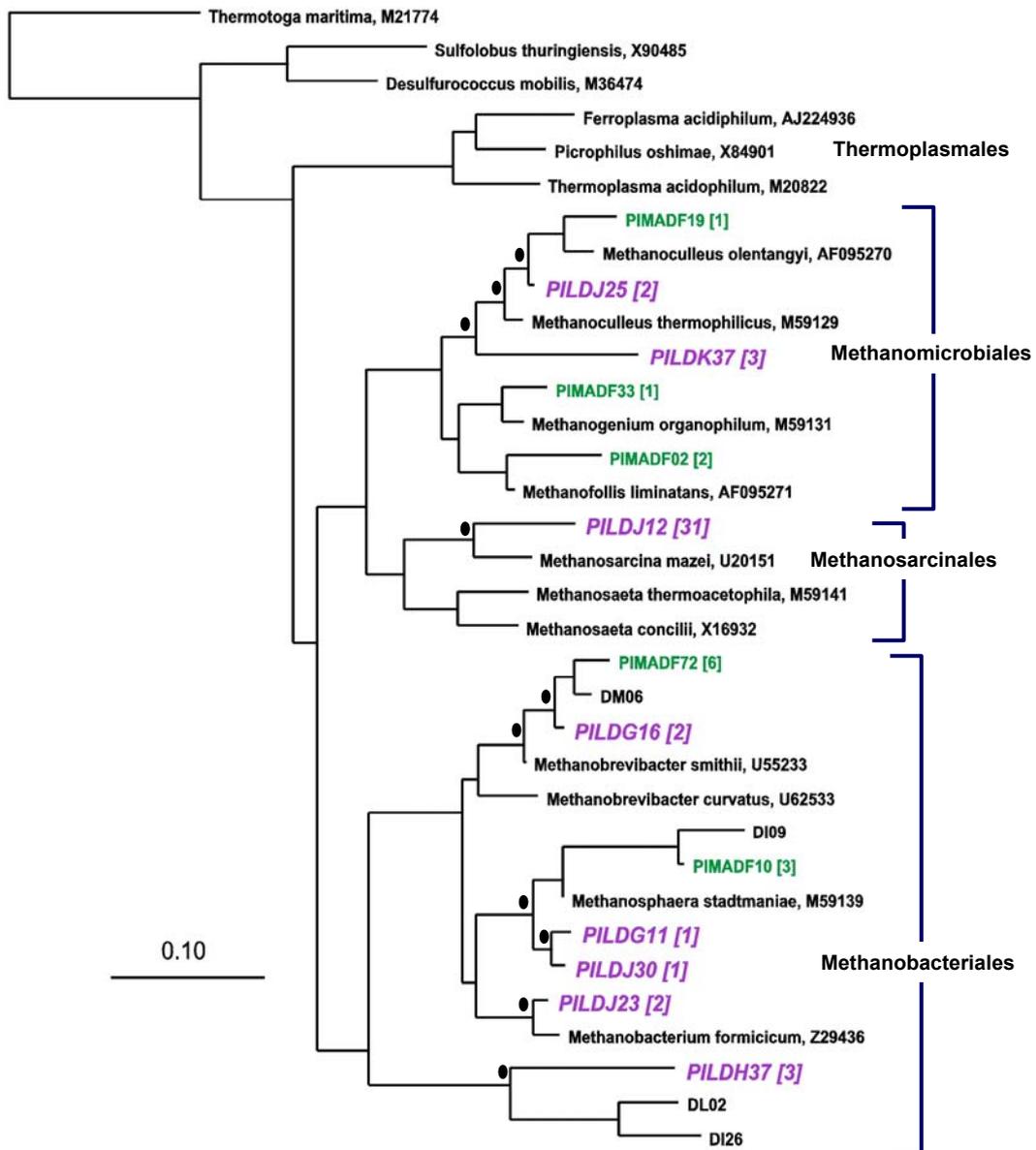


Figure 6.9. Emplacement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S affiliées aux groupes *Archaea* méthanogènes *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* et *Methanosarcinales*. Les autres caractéristiques sont indiquées dans la figure 6.1.

Les deux phylotypes affiliés aux *Methanomicrobiales* (PILDK37 et PILDJ25) sont liés à *Methanoculleus olentangyi*. Ils représentent 11 % des séquences affiliées aux méthanogènes.

Le phylotype (PILDJ12) domine largement la banque *Archaea* avec 31 séquences. Il est affilié aux *Methanosarcinales*. Ce phylotype est modérément proche de *Methanosarcina mazei* (**Fig 6.9**), une méthanogène acétotrophe typique des boues de réacteurs d'épuration des eaux usées.

6.3. Conclusion

L'analyse de l'écosystème des fumiers de porcs a montré qu'il s'agit d'un environnement en transition anaérobie-aérobie où il y a un changement des populations surtout bactériennes par rapport au tractus digestif porcin et au lisier :

- Dans les banques d'ADNr 16S de fumier, seulement 3 phylotypes bactériens (5 séquences) ont été identiques à des phylotypes du lisier.
- Plusieurs groupes *Bacteria* présents dans le tractus digestif porcin et le lisier comme le groupe *Clostridium coccooides*, le sous-groupe *C. leptum*, les *Sporomusa* et les *Prevotella* ont disparu dans le fumier.
- Contrairement au tractus digestif porcin et au lisier, une communauté de bactéries nitrifiantes affiliée aux Proteobacteria est apparue dans le fumier où l'on trouve une importante quantité d'ammoniac qui est utilisé par ces bactéries comme substrat pour réaliser la nitrification. D'après la littérature, de nombreuses populations microbiennes hétérotrophes nitrifiantes comme *Pseudomonas* spp., et autotrophes comme *Nitrosomonas europaea*, peuvent être actives dans ce type d'écosystème. Probablement, ces bactéries ne se trouvent pas dans l'intestin de porc, les fèces ou même le lisier, dû à l'absence d'oxygène dans ces environnements pour réaliser la nitrification. Dans le fumier, où les conditions sont plutôt aérobies, elles sont présentes avec une grande diversité.
- Les *Mycoplasma* et apparentées ont été nombreuses dans les fumiers et lisiers suggérant une forte capacité de ce groupe à s'adapter aux changements environnementaux et à persister dans ce type d'écosystème.
- Trois clusters de phylotypes non affiliés ont été obtenus à partir des banques d'ADNr 16S du fumier. Ils représentent presque un tiers de la diversité et de l'abondance de l'inventaire et montrent la nécessité de mieux caractériser ce type d'écosystème.

La description des phylotypes de la communauté *Archaea* a montré une structure différente de celle du lisier avec 44 % des séquences qui appartiennent à un phylotype méthanogène acétotrophe. Sa présence pourrait expliquer la basse concentration d'acétate dans le fumier par rapport au lisier. L'importance du groupe non cultivé CA11 dans les déjections porcines a été confirmée. Les phylotypes *Archaea* de ce groupe semblent former trois clusters contenant seulement des séquences originaires de lisier ou de fumier. Les autres phylotypes *Archaea* ont été proches de méthanogènes utilisatrices d' H_2/CO_2 trouvées dans les tubes digestifs et le rumen, ainsi que dans les lisiers.

RESULTATS : CHAPITRE 7

CHAPITRE 7

Mise au point d'un système de détection d'un indicateur de contamination fécale porcine par PCR quantitative

7.1. Les objectifs et la stratégie

7.1.1. Les objectifs

L'**objectif général** était le développement d'un système de PCR quantitative (PCRq) permettant la détection et la quantification de micro-organismes potentiellement indésirables, comme les indicateurs fécaux de porc, en sortie de la filière d'élevage jusqu'à l'épandage.

La réalisation de ce travail a demandé (**Figure 7.1**) :

- 1) Le choix d'un phylotype spécifique et suffisamment représenté dans le lisier et le fumier pour être un bon candidat d'indicateur de contamination fécale de porcs.
- 2) Le dessin d'un système de détection et de quantification par PCRq du phylotype choisi et sa validation *in silico*.
- 3) La mise au point et la réalisation d'amplification *ex situ* sur des échantillons de la filière.

Ce travail s'est accompagné de :

- La quantification globale de la communauté microbienne des effluents d'élevage par PCRq des ADNr 16S totaux (Suzuki *et al.*, 2000).
- L'utilisation d'un système de détection des entérocoques par PCRq sur les échantillons de la filière (Frahm et Obst, 2003), et la comparaison des résultats obtenus avec des comptages réalisés par des méthodes classiques de bactériologie médicale (Etalements sur milieux sélectifs) dans le laboratoire de H. Brugère à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

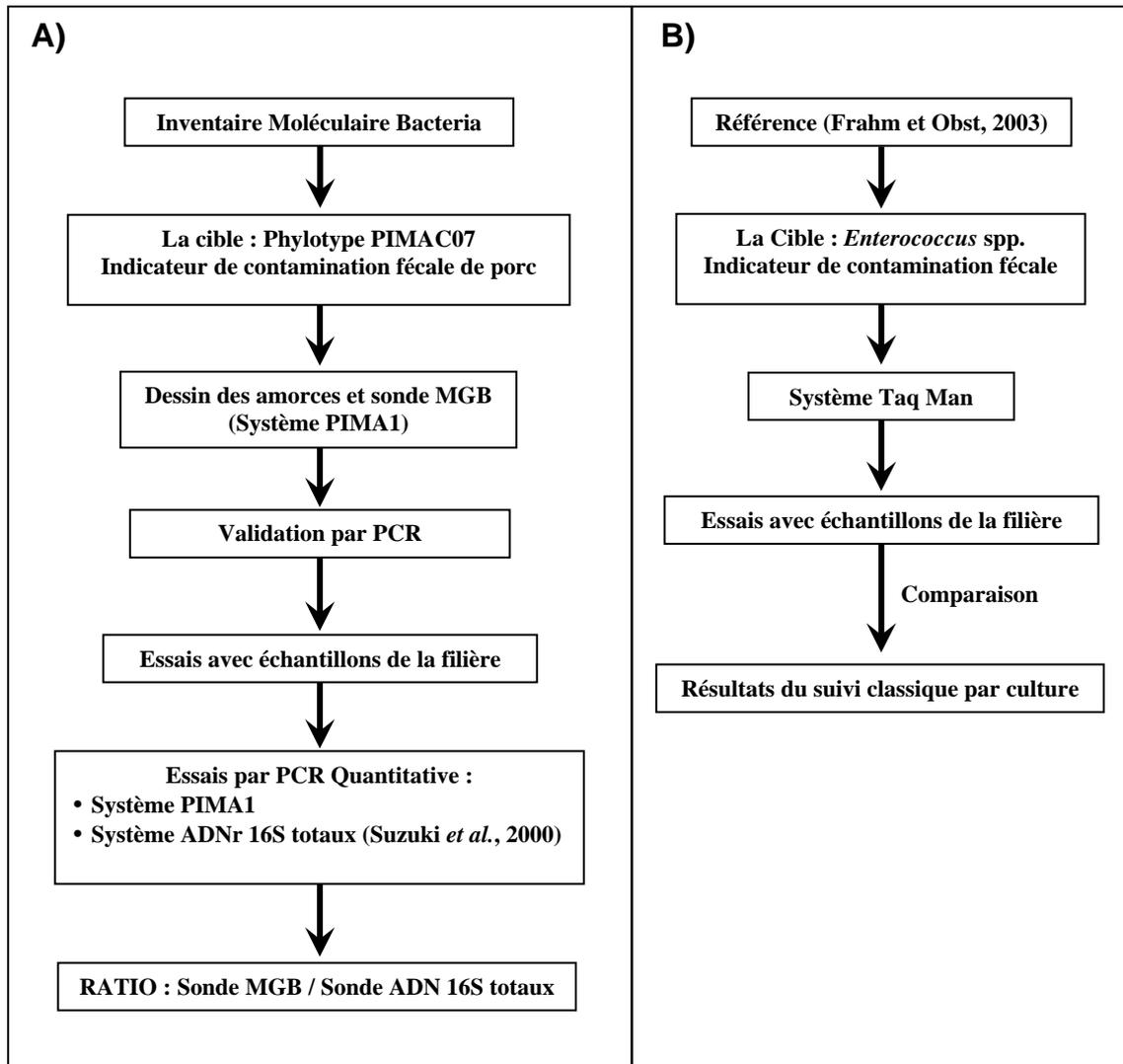


Figure 7.1. Méthodologie utilisée pour la détection et la quantification des indicateurs de contamination fécale dans la filière d'Albi. La stratégie suivie pour le système développé à partir d'un clone de l'environnement est indiquée en A, celle pour le système déjà publié est en B.

Une campagne de prélèvements a été mise en place sur un élevage de type caillebotis avec la collaboration du groupement MidiPorc et de l'ASAMIP de Toulouse. Après le prélèvement de 55 échantillons, 34 ont été choisis (3 de chaque étape de la filière au minimum) pour faire le suivi (voir Fig. 4.1 en M&Ms et Annexes : Tableau a.7.1). Ensuite, l'ADN total a été extrait avec la même technique pour tous les échantillons et des dilutions ont été préparées pour les réactions de PCRq (Figure 7.1). Deux types d'épandage sont pratiqués dans l'élevage étudié : un agriculteur épand du lisier brut directement puisé dans la fosse de stockage tandis qu'un autre utilise le "lisier traité" puisé dans la lagune de traitement (voir Figure 5.2 en M&Ms).

7.2. Résultats et discussion

7.2.1. Le dessin du système PIMA1

Un système d'amorces et de sonde MGB (PIMA1) a été dessiné à partir des résultats des inventaires moléculaires de lisiers et de litières de porcs. Le choix du groupe microbien cible a été effectué sur les critères suivants : *i*) ce groupe est spécifique des déjections porcines (lisier et fumier), *ii*) ce groupe présente une affiliation phylogénétique bien définie et contient plusieurs séquences provenant d'inventaires indépendants et, *iii*) ce groupe est *a priori* numériquement abondant dans les échantillons (pour éviter les problèmes de limites de détection que l'on pourrait rencontrer avec la PCRq dans un échantillon environnemental complexe).

Le groupe qui a finalement été choisi est formé par *S. alactolyticus* (AF201899) isolé de l'intestin de porc, une séquence obtenue dans l'inventaire du tube digestif porcine (AF371504) et les phylotypes PIMALC07 et PILALG12 (**Fig. 7.2**). Ces derniers représentent 5 % et 3 % des séquences bactériennes des inventaires de lisier et de fumier de porcs, respectivement. Quatre autres séquences obtenues d'un autre inventaire de lisier de porcs (originaire de l'INRA de St. Gilles) appartiennent à ce groupe.

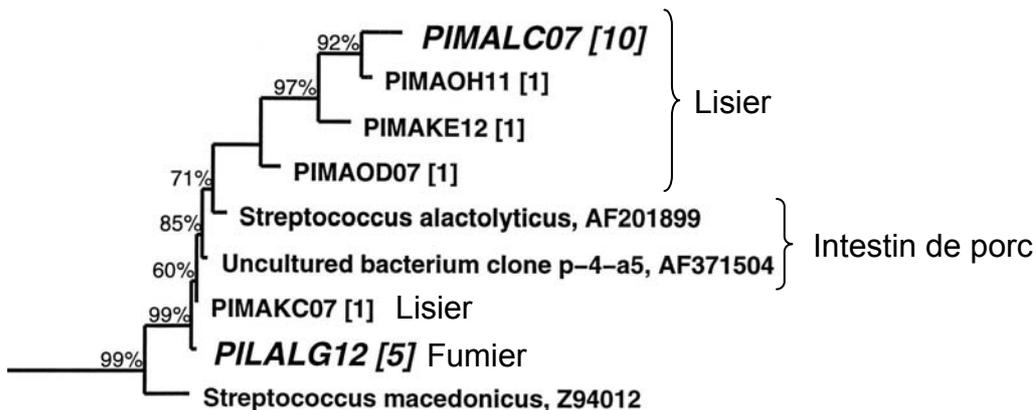


Figure 7.2. Groupe affilié à la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* utilisé pour le développement de l'indicateur de contamination fécale de porcs. Le pourcentage sur les branches indique la valeur de bootstrap. *Streptococcus macedonicus* (Z94012) est hors du groupe.

La divergence au sein du groupe est au maximum de 1,5 %, c'est-à-dire que toutes les séquences du groupe sont dans la limite considérée pour une espèce phylogénétique (<3 %) dans cette étude.

Les streptocoques fécaux sont considérés comme des indicateurs plus efficaces que les coliformes fécaux pour l'évaluation des procédés d'hygiénisation des boues de station d'épuration. Ils gardent un meilleur rapport de densité avec les pathogènes et les entérovirus pendant les traitements (Strauch, 1987).

Le système d'amorces et de sonde a été dessiné à partir des 481 paires de bases de la région 5' du gène ribosomique 16S du clone PIMALC07 avec l'aide du logiciel PRIMER EXPRESS fourni par Applied Biosystems. La recherche a été axée sur les parties très variables de la séquence (**Fig. 7.3**).

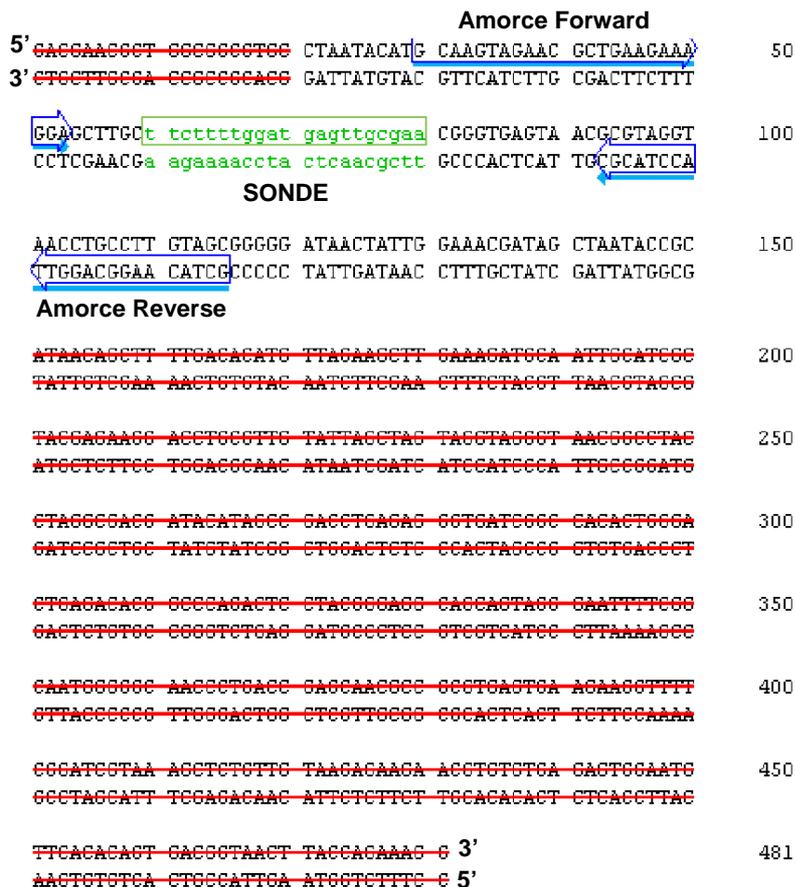


Figure 7.3. Séquence du clone PIMALC07 utilisée pour le dessin du système PIMA1. Les chiffres indiquent le nombre de nucléotides. La partie de séquence barrée en rouge n'a pas été considérée pour trouver les amorces. Les flèches bleues montrent les séquences des amorces. La séquence de la sonde MGB apparaît en vert.

Après plusieurs essais automatiques et manuels, le couple d'amorces et la sonde présentés dans le **Tableau 7.1** ont été choisis.

Tableau 7.1. Séquences des amorces et de la sonde du système PIMA1.

Amorces	Séquences	Position (<i>E. coli</i>)
W119	5'-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-3'	Forward, 57 à 80
W120	5'-GCTACAAGGCAGGTTACCTACGC-3'	Reverse, 122 à 143
<u>W139</u>	5'-TTCGCAACTCATCCAAAAGAA-3'	Sonde, 88 à 109

Ils possèdent toutes les caractéristiques requises pour la PCRq (**Tableau 7.2**). La première vérification ayant donné un résultat positif pour toutes les caractéristiques du système sauf pour la sonde qui possédait plus de G que de C, la séquence complémentaire de la sonde a été utilisée pour éliminer cet inconvénient. Une deuxième vérification en utilisant la sonde complémentaire a donné des résultats totalement satisfaisants.

Tableau 7.2. Caractéristiques des amorces et de la sonde du système PIMA1.

Caractéristiques	PIMA 1
Tm des amorces doit être entre 58 et 60 °C	✓
Tm de la sonde doit être entre 68 et 70 °C	✓
Les contenus en G+C doivent être entre 30 et 80 %	✓
Avoir moins de 3 G consécutifs dans les amorces et la sonde	✓
Il faut une absence de G dans l'extrémité 5' de la sonde	✓
La sonde doit avoir plus de C que de G ^a	✓ (c)
La sonde MGB a une extrémité 3' riche en A/T ^b	✓
L'extrémité 3' du primer forward avec moins de 2 GC	✓
L'amplicon doit avoir une taille entre 50-150 bases	✓

a. On peut utiliser la séquence complémentaire.

b. Important pour la stabilisation de la sonde MGB (kutyavin *et al.*, 2000).

(c) = Complémentaire.

La spécificité du système a été vérifiée par ordinateur (*in silico*) en utilisant les bases de données disponibles et les logiciels de vérification des séquences nucléotidiques.

7.2.2. Vérification *in silico* des amorces et de la sonde du système PIMA1

La vérification *in silico* du système a été faite avec trois outils : *i*) l'outil Probe match du logiciel ARB, *ii*) l'outil Probe match du RDP II¹, et *iii*) l'outil Blast du National Center of Biotechnology Information² (**Tableau 7.3**).

L'**amorce forward**, sans mésappariement, a donné comme séquences cibles uniquement des séquences liées aux environnements intestinaux de porcs, y compris toutes les séquences du cluster *S. alactolyticus* choisi, des séquences de micro-organismes non cultivés obtenues du tractus intestinal de porcs, de fèces de truies et d'une fosse de stockage de lisier. Cette amorce, avec 1 mésappariement, cible d'autres streptocoques (non fécaux) et des séquences isolées de la valve aortique du cœur d'un patient présentant une endocardite. Une séquence de streptocoque du groupe G (*beta*-hémolytique)³ est ciblée avec 2 mésappariements. Les séquences ciblées avec 3 ou 4 mésappariements appartiennent à des streptocoques, ou à des micro-organismes non cultivés provenant d'environnements intestinaux, de fèces ou de lisier de porcs, ou encore de la valve aortique mentionnée ci-dessus.

L'**amorce reverse**, sans mésappariement, cible toutes les séquences prises par l'amorce forward plus 3 séquences de streptocoques (non fécaux) et deux séquences de micro-organismes non cultivés obtenues de la cavité buccale humaine. Les séquences ciblées avec un mésappariement sont des *Streptococcus* spp. et des séquences isolées de la valve aortique déjà citée. Le phylotype du lisier PIMALC24 et plusieurs séquences de streptocoques sont ciblées avec 2 mésappariements, l'un d'entre eux, *S. bovis*, a été isolé de l'intestin de bovins. Plusieurs autres séquences (toutes non fécales) sont ciblées avec 3 et 4 mésappariements dont *Clostridium symbiosum*, *Eubacterium eligens*, *Lactobacillus reuteri* et PIMALD40.

¹ <http://rdp.cme.msu.edu/html>.

² <http://www.ncbi.nlm.gov>.

³ Les souches du groupe G sont uréase positives, alpha-hémolytiques. Elles ont été isolées de l'intestin de porcs. Elles appartiennent à l'espèce *Streptococcus alactolyticus*.

Tableau 7.3. Vérification *in silico* de la spécificité des amorces et de la sonde du système PIMA1.

Vérification de l'amorce Forward :		
Micro-organismes hybridés	Séquence de l'amorce 5'-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-3'	Nombre de més-appariements
Séquence de la cible		
PIMALC07 ^a	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
<i>S. lactolyticus</i> (AF201899) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Uncultured manure pit bacterium (AF261797) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Uncultured manure pit bacterium (AF261815) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Uncultured swine feces bacterium (AF261777) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Swine fecal bacterium FPC56 (AF445231) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Swine fecal bacterium FPC69 (AF445229) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Swine fecal bacterium FPC72 (AF445230) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Swine fecal bacterium FPC75 (AF445228) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Uncultured bacterium clone p-4-a5 (AF371504) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Uncultured bacterium clone p-2-a5 (AF371505) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
Uncultured bacterium clone p-29-a5 (AF371506) ^c	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAAAGGA-81	0
<i>S. pneumoniae</i> (AB002522) ^{a,b}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAG <u>G</u> AAGGA-81	1
<i>S. salivarius</i> (M58839) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGA <u>G</u> AGGA-81	1
<i>S. sanguis</i> (AF003928) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGA <u>G</u> AGGA-81	1
<i>S. thermophilus</i> (AY188354) ^{b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGA <u>G</u> AGGA-81	1
Uncultured Eubacterium clone v5 (U87829) ^{a,b,d}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGA <u>G</u> AGGA-81	1
Uncultured Eubacterium clone v3 (U87828) ^{a,b,d}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGA <u>G</u> AGGA-81	1
Streptococcus group G (AB002517) ^{a,b}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAC <u>C</u> AGG <u>I</u> -81	2
<i>S. canis</i> (AB002483) ^{a,b}	56-GCAAGTAGAACGCTGAG <u>G</u> AC <u>C</u> AGG <u>I</u> -81	3
<i>S. parauberis</i> (X89967) ^{a,b}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAC <u>CT</u> GG <u>I</u> -81	3
Uncultured Eubacterium clone v6 (U87830) ^{a,b,d}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAGAC <u>CT</u> GG <u>I</u> -81	3
<i>S. porcinus</i> (AB002523) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGC <u>A</u> GAG <u>G</u> AC <u>C</u> AGG <u>I</u> -81	4
<i>S. suis</i> (AB002525) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAG <u>TCT</u> GG <u>I</u> -81	4
<i>S. mitis</i> (AF003929) ^{a,b,c}	56-GCAAGTAGAACGCTGAAG <u>GAGG</u> <u>A</u> G-81	4

Vérification de l'amorce Reverse :		
Micro-organismes hybridés	Séquence de l'amorce 5'-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-3'	Nombre de més- appariements
Séquence de la cible		
PIMALC07 ^a	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
<i>S. alactolyticus</i> (AF201899) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
<i>S. salivarius</i> (M58839) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
<i>S. thermophilus</i> (AY188354) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
<i>S. vestibularis</i> (AY188353) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Uncultured bacterium clone p-4-a5 (AF371504) ^{a,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Uncultured bacterium clone p-2-a5 (AF371505) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Uncultured bacterium clone p-29-a5 (AF371506) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Uncultured manure pit bacterium (AF261797) ^{a,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Uncultured manure pit bacterium (AF261815) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Uncultured swine feces bacterium (AF261777) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Swine fecal bacterium FPC56 (AF445231) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Swine fecal bacterium FPC69 (AF445229) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Swine fecal bacterium FPC72 (AF445230) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Swine fecal bacterium FPC75 (AF445228) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Unidentified oral bacterium RP55 (AB028419) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
Unidentified oral bacterium SH3 (AB028324) ^c	121-GCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGC-145	0
<i>S. sanguis</i> (AF003928) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
<i>S. pneumoniae</i> (AF003930) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
<i>S. mitis</i> (AF003929) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
<i>S. oralis</i> (AF003932) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
<i>S. gordonii</i> (D38483) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
Uncultured Eubacterium clone v5 (U87829) ^{a,b,d}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
Uncultured Eubacterium clone v3 (U87828) ^{a,b,d}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
Uncultured Eubacterium clone v6 (U87830) ^{a,b,d}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> GTAGC-145	1
PIMALC24 ^a	121-GCGT <u>G</u> GGTAACCTGCCTTGTAG <u>C</u> -145	2
<i>S. porcinus</i> (AB002523) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTA <u>C</u> CTT <u>A</u> TAGC-145	2
<i>S. suis</i> (AF009475) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>C</u> A TAGC-145	2
<i>S. bovis</i> (M58835) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>A</u> C TAGC-145	2
<i>S. hyointestinalis</i> (AB002518) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> A TAGC-145	2
<i>S. sobrinus</i> (AJ243966) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>G</u> A TAGC-145	2
<i>S. agalactiae</i> (AF015927) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>C</u> A TAGC-145	2
<i>S. parasanguis</i> (AF003933) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>C</u> T TAGC-145	2
<i>S. mutans</i> (AJ243965) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCT <u>A</u> T TAGC-145	2
<i>Clostridium symbiosum</i> (M59112) ^{a,b,c}	121-GCGT <u>G</u> GGTAACCTGCCTTGTAG <u>A</u> C T-145	3
<i>Eubacterium eligens</i> (L34420) ^{a,b,c}	121-GCGT <u>G</u> GGTAACCTGCCTTGTAG <u>A</u> C T-145	3

<i>E. moniliforme</i> (L34622) ^{a,b,c}	121-GCGT <u>GGG</u> TAACTGCCTTGTACA-145	3
<i>S. macedonicus</i> (Z94012) ^{a,b,c}	121-GCGTAGGTAACCTGCCTATITAGT-145	3
Uncultured bacterium clone p-2409-55G5 (AF371677) ^a	121-GCGT <u>GGG</u> TAACTGCCTTGCAG-145	3
Uncultured bacterium clone vadin (U81763) ^a	121-GCGT <u>GGG</u> TAACTGCCTTGTACT-145	3
PIMALD40 ^a	121- <u>ACG</u> TAGGTAACCTGCC <u>CCGG</u> AGC-145	4
Uncultured bacterium clone p-165-a2(AF371482) ^{a,c}	121- <u>ACG</u> TAGGTAACCTGCC <u>CCGG</u> AGC-145	4
<i>L. reuteri</i> (X76328) ^{a,b,c}	121- <u>ACG</u> TAGGTAACCTGCC <u>CCGG</u> AGC-145	4
PIMALE84 ^a	121- <u>ACG</u> TAGGTAACCTGCC <u>CCGG</u> AGC-145	4
PIMALC02 ^a	121- <u>ACG</u> T <u>GGG</u> TAACTGCC <u>CTT</u> ITAGC-145	4
Swine manure pit bacterium PPC79 (AF445283) ^{a,c}	121- <u>ACG</u> T <u>GGG</u> TAACTGCC <u>CTT</u> ITAGC-145	4

Vérification de la Sonde :

Micro-organismes hybridés	Séquence de la sonde 5'- TTCTTTGGATGAGTTGCGAA -3'	Nombre de més- appariements
Séquence de la cible		
PIMALC07 ^a	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
<i>S. alactolyticus</i> (AF201899) ^{a,c}	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Uncultured bacterium clone p-4-a5 (AF371504) ^{a,c}	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Uncultured manure pit bacterium (AF261797) ^{a,c}	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Uncultured manure pit bacterium (AF261815) ^{a,c}	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Uncultured swine feces bacterium (AF261777) ^{a,c}	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Swine fecal bacterium FPC56 (AF445231) ^c	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Swine fecal bacterium FPC69 (AF445229) ^c	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Swine fecal bacterium FPC72 (AF445230) ^c	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
Swine fecal bacterium FPC75 (AF445228) ^c	88-TTCTTTGGATGAGTTGCGAA-108	0
<i>S. pneumoniae</i> (AF003930) ^{a,b}	88-TTCT <u>CT</u> TGGATGAGTTGCGAA-108	1
<i>S. hyointestinalis</i> (AB002518) ^{a,b}	88-TTCTT <u>CT</u> TGGATGAGTTGCGAA-108	1
<i>S. infantis</i> (AY485603) ^{b,c}	88- <u>CT</u> TCTT <u>CT</u> TGGATGAGTTGCGAA-108	2
<i>S. intestinalis</i> (AB002519) ^{a,b}	88- <u>CC</u> CTTTGGATGAGTTGCGAA-108	2
<i>S. salivarius</i> (M58839) ^{a,b}	88- <u>CTT</u> CTTGGATGAGTTGCGAA-108	3
<i>S. thermophilus</i> (AY188354) ^b	88- <u>CTT</u> CTTGGATGAGTTGCGAA-108	3
<i>S. sanguis</i> (AF003928) ^{a,b}	88- <u>CTT</u> CTTGGATGAGTTGCGAA-108	3
<i>S. sanguinis</i> (X53653) ^{a,b}	88- <u>CTT</u> CTTGGATGAGTTGCGAA-108	3
<i>Brevibacterium iodinum</i> (X76567) ^{a,b}	88-TTCT <u>GG</u> TGGATGAGT <u>G</u> GCGAA-108	3
Uncultured Eubacterium clone v5 (U87829) ^{a,b,d}	88- <u>CTT</u> CTTGGATGAGTTGCGAA-108	3
Uncultured Eubacterium clone v3 (U87828) ^{a,b,d}	88- <u>CTT</u> CTTGGATGAGTTGCGAA-108	3
<i>Microbacterium keratanolycum</i> (Y17233) ^a	88- <u>CT</u> TCTT <u>G</u> TGGAT <u>C</u> AGT <u>G</u> GCGAA-108	4
<i>Amycolatopsis coloradensis</i> (AF051341) ^a	88-TTC <u>GGG</u> TGGATGAGT <u>G</u> GCGAA-108	4
<i>Actinomyces viscosus</i> (X82453) ^a	88- <u>TGG</u> TT <u>CT</u> TGGATGAGT <u>G</u> GCGAA-108	4

a = Outil Probe match du logiciel ARB.

b = Outil Probe match de RDP II.

c = Outil Blast du National Center of Biotechnology Information.

d = Séquence isolée de la valve aortique du cœur d'un patient présentant une endocardite.

La **sonde**, qui donne la spécificité de la détection en PCRq, cible sans mésappariement le phylotype PIMALC07, *S. alactolyticus* et des séquences de micro-organismes non cultivés originaires du tractus intestinal de porc, de fèces de truies et d'une fosse de stockage de lisier. L'analyse de la sonde avec 1, 2 et 3 mésappariement(s) détecte des séquences de streptocoques connus, *Brevibacterium iodinum* et deux des séquences obtenues de l'analyse de l'endocardite déjà citées plus haut. Trois séquences de bactéries Gram positives à haut GC % sont ciblées avec 4 mésappariements.

En bref, le système dans son ensemble est spécifique avec 0 mésappariement pour PIMALC07, *S. alactolyticus* et plusieurs clones isolés des déjections de porcs qui sont liés à ce streptocoque. La spécificité du système a été considérée adéquate pour son application sur des échantillons environnementaux.

7.2.3. Vérification des amorces par PCR non quantitative

La spécificité des amorces a été testée par PCR en point final en utilisant les conditions décrites pour la PCR - 16S *Bacteria* (dénaturation initiale de 2 min à 94°C ; 25 cycles : 1 min. à 94°C, 1 min. à 50°C, 1 min. à 72°C ; une élongation finale de 10 min. à 72°C). Cette vérification a été faite à partir de l'ADN des échantillons suivants:

- Clone PIMALC07 (phylotype cible choisi pour le dessin du système)
- Clone PIMALD40 (phylotype non cible, lié à *Lactobacillus reuteri*, c'est le phylotype le plus abondant de l'inventaire du lisier)
- Lisier de la préfosse (supposé positif)
- Fèces de porcs (supposé positif)
- Sol épandu avec du lisier (supposé positif mais à un taux très bas)
- Boue de digesteur anaérobie (supposé négatif)
- Eau (contrôle négatif)

Les produits de PCR ont été observés par électrophorèse en gel d'agarose 2 % et marquage au bromure d'éthidium. Seul l'échantillon PIMALC07 a donné un résultat positif, de la taille prévue (environ 80 pb), après 25 cycles d'amplification. Ce résultat a

confirmé la spécificité des amorces dans le sens où seul le représentant du groupe ciblé (PIMALC07) a été amplifié. En revanche, l'absence d'amplification sur les échantillons supposés positifs a suggéré la présence d'inhibiteurs ou d'un nombre trop faible de cible pour une PCR de 25 cycles.

Un second essai d'amplification a été réalisé à 40 cycles. Tous les échantillons se sont alors révélés positifs. Cependant, les échantillons supposés négatifs ont présenté une quantité de produit de PCR très inférieure à celle des échantillons supposés positifs. Ces résultats ont été considérés comme une indication de la présence de la séquence cible dans les échantillons environnementaux complexes liés au lisier de porcs; et surtout, comme suffisamment encourageants pour poursuivre l'étude avec le système de PCRq. En effet, il n'est pas rare d'obtenir de faibles amplifications de témoins négatifs lors de réactions de PCR en point final (faux positifs). L'analyse des cinétiques d'amplification en PCRq permet de distinguer les vraies amplifications de faibles quantités d'ADN par rapport aux faux positifs.

7.2.4. Préparation des standards pour la droite étalon

La quantification absolue par PCRq requiert la comparaison des échantillons avec une droite étalon obtenue à partir d'ADN standard. Ces standards ont été produits par amplification de l'insert du clone PIMALC07 ayant servi à la conception des amorces et de la sonde. L'ADN produit par cinq réactions de PCR a été groupé, purifié et concentré pour obtenir un fragment cible à 241 µg/µL. Le nombre de copies de cible par µL de standard a été calculé (**voir Annexes : Tableau a7.3**) et 27 dilutions ont été réalisées (**voir Annexes : Tableau a4.1**). Les standards ont été aliquotés et gardés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les essais de PCRq.

7.2.5. Optimisation des amorces

Les amorces ont été optimisées selon les recommandations du manuel du constructeur du thermocycleur. Les amplifications de 3 standards (S6, S9 et S12) ont été réalisées en triple dans un volume réactionnel de 25 µL avec une concentration de sonde à 200 nM (**Tableau 7.4**). Le manuel indique qu'optimiser la concentration de la sonde est inutile, il faut utiliser une concentration de 100 ou 200 nM.

Tableau 7.4. Réactifs pour la réaction PCRq du système PIMA1 (essai d'optimisation des amorces).

Réactifs :	Concentration finale (nM)	1 échantillon (µL)
Master mix (enzyme + tampon + dNTP)	n.a.	12,5
Eau ultra pure	n.a.	4,5
Sonde w139	200	1
Amorce forward w119	Variable (indiquée dans le texte)	1
Amorce reverse w120	Variable (indiquée dans le texte)	1
ADN (Standards)	S6, S9 et S12	5,0
VOLUME FINAL DE LA REACTION :		25 µL

n.a. non appliqué.

Les couples de concentrations d'amorces testés ont été 100/100, 350/350 et 700/700 nM. La concentration de 100 nM est la concentration optimale pour la PCR non quantitative. La concentration la plus élevée a été choisie dans le but d'obtenir une quantité d'amorces non limitante pour les réactions. Aucune référence bibliographique ne dépasse 700 nM, même si le manuel recommande 900 nM.

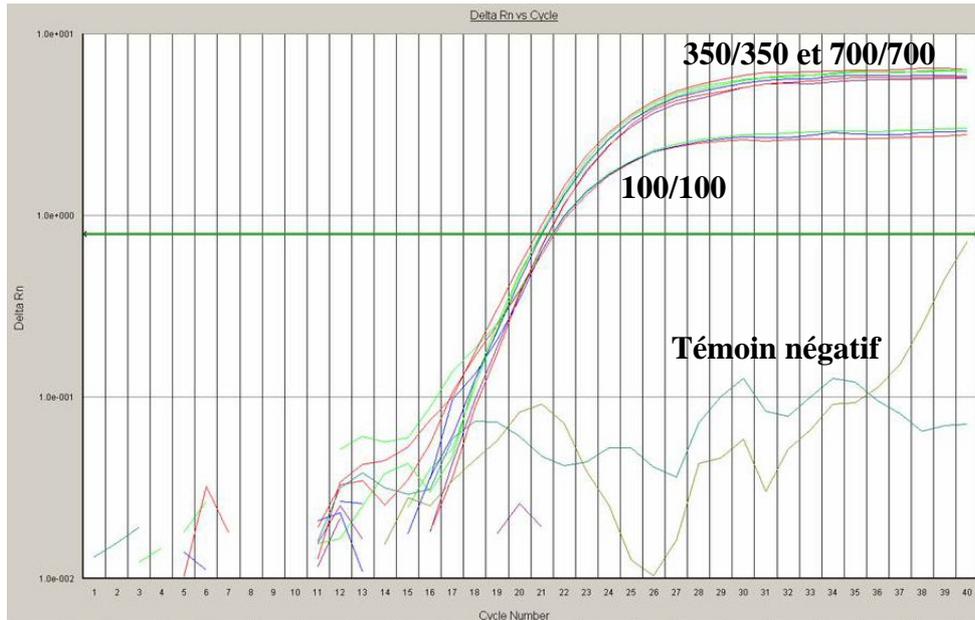
Tous les couples de concentrations d'amorces ont été évalués par rapport à l'efficacité d'amplification de l'ADN et au coefficient de corrélation de la droite étalon produite pendant la PCRq (**Tableau 7.5**).

Tableau 7.5. Efficacités d'amplification et coefficients de corrélation obtenus pour les cinétiques des trois couples d'amorces testés en PCRq (Premier essai).

	Concentration des amorces (Forward/Reverse)		
	100 / 100	350 / 350	700 / 700
Efficacité ou Rendement	90 %	97 %	93 %
Coefficient de corrélation	0,999	0,996	0,999

Le couple de concentration 100/100 s'est révélé limitant pour la réaction de PCR car le rendement d'amplification observé (ΔRn) est inférieur à ceux des autres couples de concentrations testés. C'est le couple 350/350 qui a le meilleur rapport efficacité d'amplification / coefficient de corrélation (**Fig. 7.4**).

Premier essai



Deuxième essai

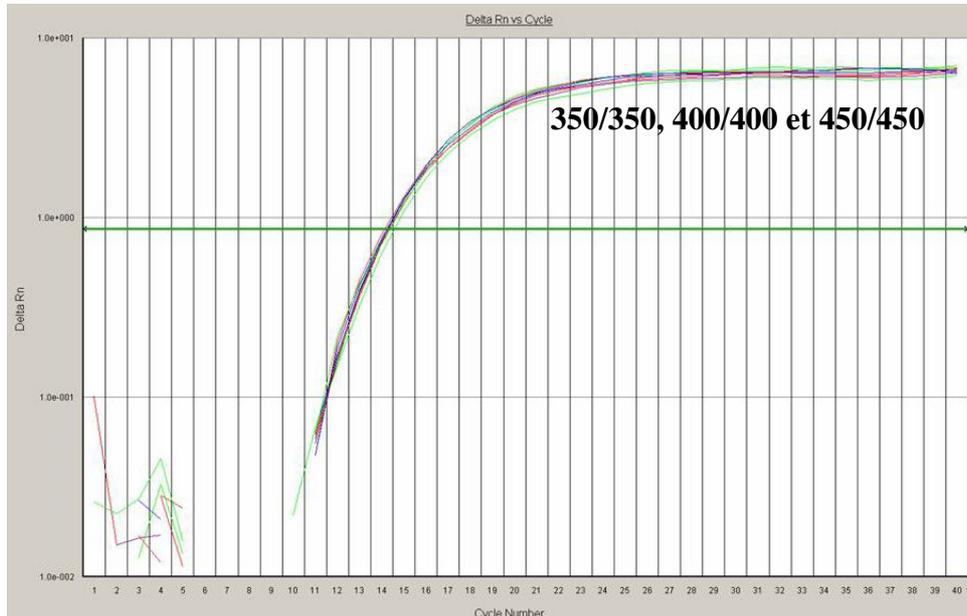


Figure 7.4. Cinétiques d'amplification des essais effectués pour l'optimisation des concentrations d'amorces. Le nombre d'amplifications ou cycles est indiqué en abscisse. L'augmentation de la fluorescence détectée à chaque cycle s'indique en ordonnée.

Un deuxième essai a été réalisé avec les couples 350/350, 400/400 et 450/450 pour tenter d'améliorer encore les réactions d'amplification (**Tableau 7.6**).

Tableau 7.6. Efficacités et coefficients de corrélation obtenus pour les cinétiques des trois couples d'amorces testées en PCRq (deuxième essai).

	Concentration des amorces (Forward/Reverse)		
	350 / 350	400 / 400	450 / 450
Efficacité ou Rendement	98 %	100 %	94 %
Coefficient de corrélation	0,997	0,996	0,995

Le couple 400/400 a montré le meilleur rapport efficacité d'amplification / coefficient de corrélation (**Fig. 7.4**). Même si le coefficient de corrélation n'a pas été amélioré, l'efficacité est passée à 100 %, c'est-à-dire que le rendement de la réaction PCR n'a pas été limité par la concentration des amorces. Ces concentrations ont été choisies pour toutes les réactions de PCRq de cette étude.

7.2.6. Réalisation de la droite étalon

Les différentes dilutions d'ADN des standards (entre S6 et S27) ont été amplifiées en triple avec la réaction de PCRq optimisée antérieurement dans le but d'obtenir la droite étalon (**Tableau 7.7**).

L'essai a été divisé en deux gammes de concentrations pour obtenir des droites étalons avec un coefficient de corrélation correct (**Fig. 7.5**). Les résultats montrent que pour les standards plus concentrés on obtient un écart type inférieur à 1 %, tandis que les standards moins concentrés S25 et S27 présentent des écarts types de 1,5 et 2,3 %, respectivement (**Fig. 7.5B**).

Tableau 7.7. Quantité d'ADN et nombre de copies de la séquence cible dans les standards testés.

Numéro du Standard (S)	Quantité d'ADN (ng/μL)	Nombre de copies / μL	Nombre de copies / réaction (25 μL)
6	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$
7	$1,2 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$
8	$4,8 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
9	$2,4 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
10	$1,2 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$
11	$4,8 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$
12	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$
13	$1,2 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$
14	$4,8 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
15	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$
16	$1,2 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$
17	$4,8 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$
18	$2,4 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$
19	$1,2 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^2$	$3,7 \times 10^3$
20	$4,8 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
21	$2,4 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$
22	$1,2 \times 10^{-7}$	75	375
23	$4,8 \times 10^{-8}$	30	150
24	$2,4 \times 10^{-12}$	15	75
25	$1,2 \times 10^{-12}$	7,5	37,5
26	$4,8 \times 10^{-13}$	3,0	15
27	$2,4 \times 10^{-13}$	1,5	7,5

La limite de détection, définie comme le nombre minimum de copies de séquence cible détectable à partir des standards, a été observée à **7,5 copies de gène cible** par réaction de PCR (volume de 25 μL). **La gamme de détection** va donc de $7,5 \times 10^7$ (S6) à 7,5 (S27) copies de gène cible par réaction de PCR. Les tentatives pour augmenter le seuil de détection en utilisant des standards plus concentrés ont été un échec dû aux limitations de la technologie utilisée.

Après avoir trouvé la limite de détection, les limites de la gamme de quantification ont été évaluées pour les échantillons de la filière.

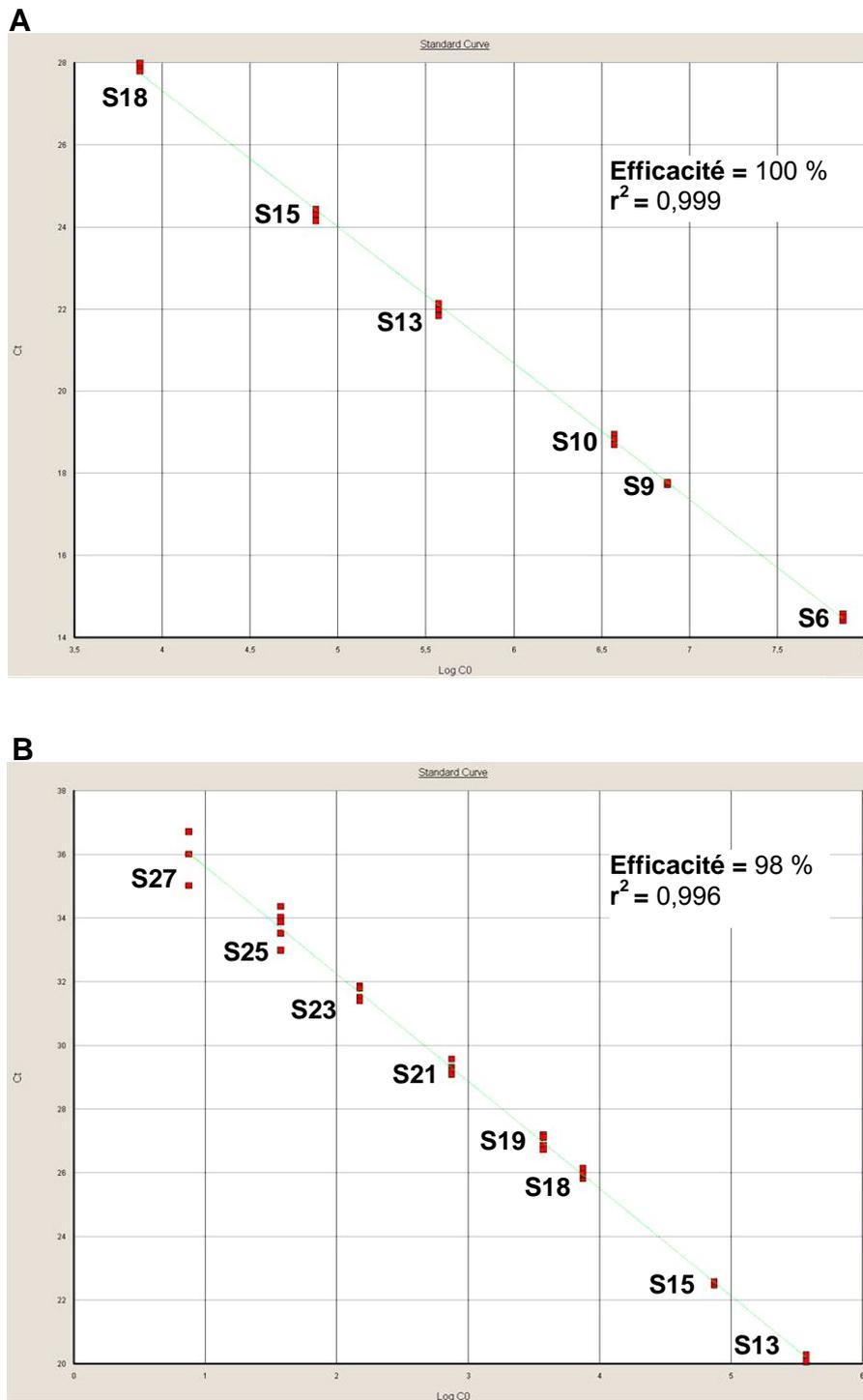


Figure 7.5. Droites étalons obtenues à partir des conditions de réaction optimisées pour le système PIMA1. (A) et (B) représentent la droite étalon des échantillons les moins et les plus dilués respectivement. Le log de la concentration d'ADN des standards est indiqué en abscisse. L'augmentation du Ct s'indique en ordonnée.

7.2.7. Essais de quantification absolue sur les échantillons de la filière

Les ADN extraits des échantillons de la filière d'élevage ont été dilués dans une gamme entre 10 et 2000 fois selon leur origine dans le but de réduire la concentration en inhibiteurs potentiels de PCR qui pourraient affecter la réaction d'amplification (**voir Annexes : Tableau a7.3**). Les échantillons dilués ont été quantifiés en triple à l'aide du système de détection PIMA1 et du système de détection des ADNr 16S totaux par rapport à une droite étalon formée au minimum de 5 standards choisis dans la gamme de S13 à S27 (**Tableau 7.7**). Pour chaque essai un témoin négatif d'eau ultra pure a été réalisé en triple.

La limite de quantification, définie sur la base des mesures présentant moins de 10% d'écart type pour les échantillons de la filière, a été évaluée à **$7,5 \times 10^2$ copies de cible** par réaction de PCR. Lorsque les échantillons ont donné des valeurs hors de la limite de quantification, la mesure a été gardée comme une approximation et doit être considérée avec précaution.

Les résultats de quantification obtenus sur les échantillons de la filière ont été calculés selon deux modes :

- **en nombre de copies de cible par gramme de matière sèche (Figure 7.6)**. Cette approche, en nombre absolu de gènes par unité de masse, permet de donner des mesures comparables à celles généralement présentées lors des dénombrements par culture. Elle correspond aussi à la demande généralement formulée par les acteurs de la filière ou le législateur. Cependant, ces mesures ne peuvent pas être utilisées pour le suivi des micro-organismes sur la filière d'élevage à cause de l'origine diverse des prélèvements. En effet, même si le rapport des données sur la quantité de matière sèche permet de régulariser les variations possibles lors des prélèvements d'un même type d'échantillon relativement homogène (comme le lisier de la fosse de stockage par exemple), il ne permet pas de comparer des prélèvements aussi différents que ceux du lisier, du liquide de la lagune et du compost ou du sol. Le passage d'un échantillon à dominance liquide à un échantillon solide très différent suppose des variations dans la nature même des MS (le ratio matière organique/micro-organismes change) mais aussi, et surtout, des capacités différentes d'extraction et d'amplification de l'ADN (présence d'inhibiteurs) (**voir Annexes : Tableau a7.2**).
- **en pourcentage de cible PIMA1 par rapport à l'ADNr 16S total de chaque échantillon de la filière (Figure 7.7)**. Cette approche consiste à calculer séparément

le nombre de copies de cible par gramme de matière sèche pour les deux systèmes et à faire le quotient des résultats système PIMA1/ADNr totaux pour chaque échantillon. Elle présente l'avantage d'intégrer à la fois les variations liées au prélèvement, à l'extraction d'ADN et aux éventuels problèmes d'inhibition de PCR.

La **Figure 7.7** montre les mesures obtenues sur les différentes étapes de la filière d'élevage. On constate que :

- 1) Les échantillons solides présentent tous des quantités d'ADNr 16S totaux inférieures à celles observées sur les échantillons liquides. Ceci suggère, soit un nombre inférieur de micro-organismes (ce qui est peu probable), soit une plus faible efficacité de l'extraction d'ADN, soit la présence d'inhibiteurs de PCR (cette possibilité sera testée plus tard).
- 2) La cible a été détectée au moins une fois dans tous les échantillons d'origine solide (fèces, fraction solide de lisier frais après séparation de phases, fraction solide de lisier composté et sols), mais elle n'a pas toujours été quantifiable à cause de son faible nombre de copies, hors des limites de quantification.
- 3) Dans le cas des fèces, les mesures obtenues ne correspondent pas à l'abondance attendue pour la séquence ciblée par PIMA1 (Leser *et al.*, 2002). Cette différence pourrait être purement technique. Elle pourrait aussi être contextuelle, en effet le groupe ciblé par PIMA1 a présenté une différence de 50 % en abondance entre les deux banques réalisées sur le tube digestif de porcs (Leser *et al.*, 2002). L'abondance de la cible pourrait être plus basse qu'attendu.
- 4) Dans les échantillons d'origine liquide (lisier de la préfosse, fosse, liquide après compression et lagune), la cible a toujours été détectée et quantifiée avec un écart type qui n'a pas dépassé 10 %. Les mesures montrent que la quantité de cible dans la **préfosse** et dans la **fosse de stockage** ne fait qu'augmenter au cours du temps, suggérant une absence d'hygiénisation du lisier sur ces étapes de l'élevage. En revanche, la quantité de cible diminue avec le temps dans les prélèvements de la lagune suggérant une bonne hygiénisation sur cette étape de l'élevage. Un désaccord est observé entre les mesures effectuées sur la lagune et le liquide de la tonne d'épandage qui a été puisé sur ce même site. Cette différence est probablement liée à une différence de profondeur entre les points de prélèvement utilisés pour les mesures sur la lagune et celui utilisé pour le remplissage de la tonne d'épandage. Ce dernier ayant été effectué à une profondeur supérieure, de la matière organique et des micro-organismes sédimentés en fond de lagune ont probablement été pompés.

5) Dans les sols, la cible n'a été détectée qu'après épandage et son faible nombre de copies était hors de la limite de quantification. Cette situation s'explique par le faible rendement de l'extraction d'ADN du sol et par la forte dilution des micro-organismes épandus.

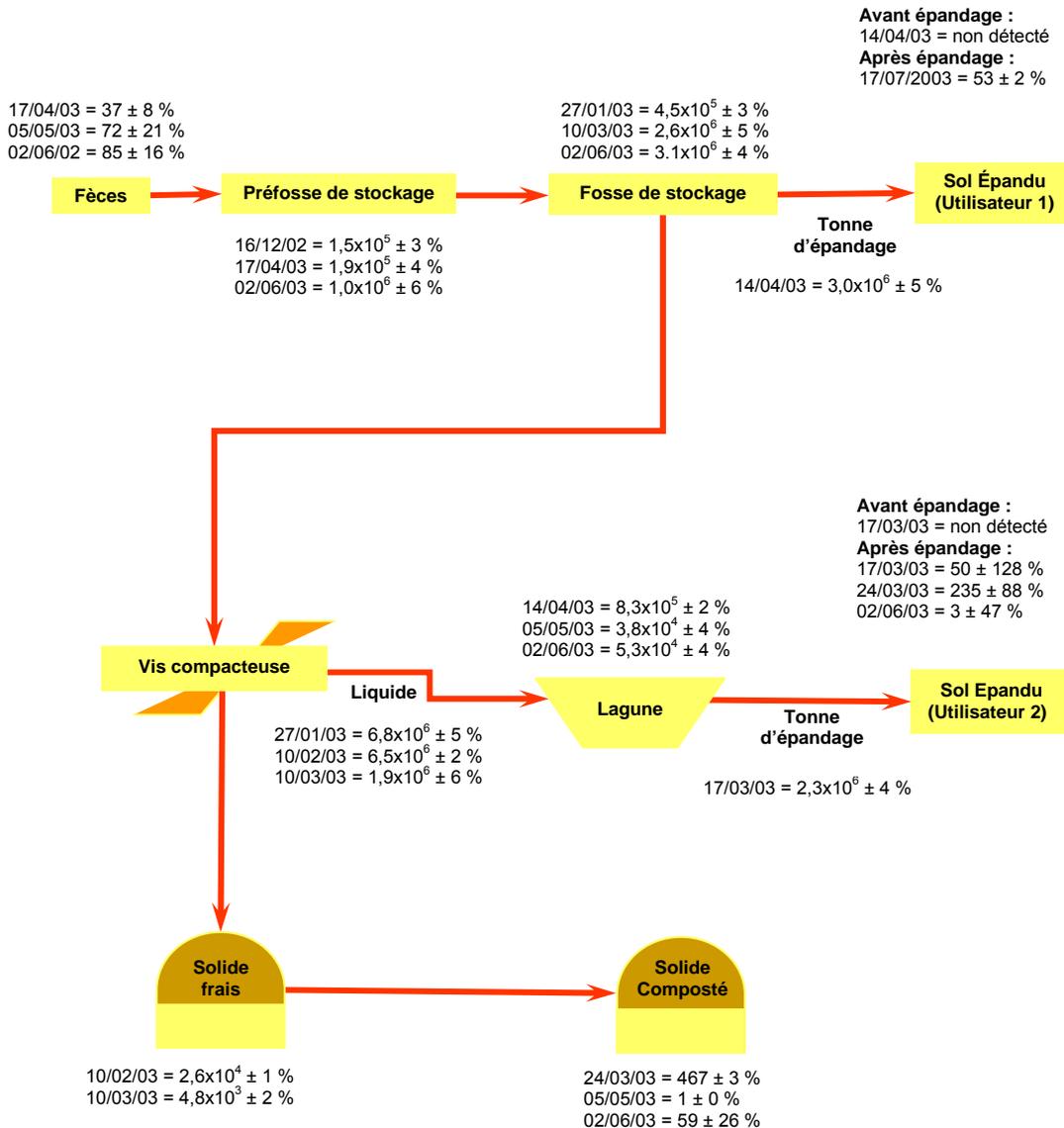


Figure 7.6. Résultats de quantification par PCRq des échantillons de la filière d'élevage. Les quantités sont en nombre de copies/g MS. Le pourcentage correspond à l'écart type des mesures. L'indication « non détecté » indique les échantillons testés où la cible n'a pas été détectée.

6) La comparaison des mesures effectuées sur la **fraction solide fraîche** en sortie de vis compacteuse avec celles effectuées sur la fraction compostée prélevée au cœur

des déchets montre une réduction importante du nombre de la cible au cours du temps. Cette forte chute suggère une étape d'hygiénisation importante ou une forte différence d'extraction et d'amplification de l'ADN entre les deux fractions (production d'acides humiques, inhibiteurs de PCR, pendant le compostage par exemple).

Les résultats présentés en pourcentage de cible par rapport à l'ADN 16S total de chaque échantillon de la filière sont dans la **Figure 7.7**.

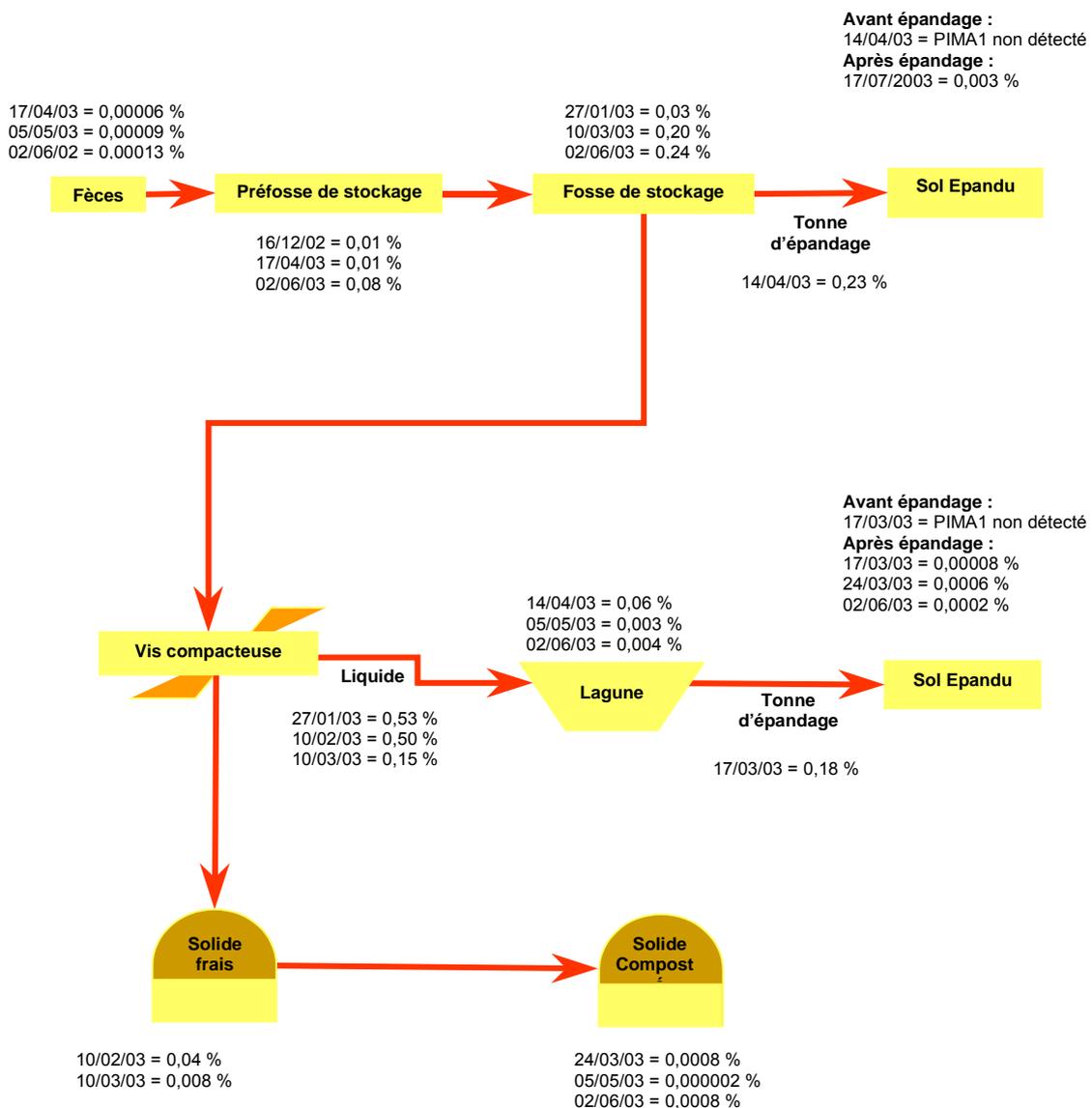


Figure 7.7. Résultats des rapports PIMA/ADNr 16S totaux (en pourcentage) pour les échantillons de la filière d'élevage. Les deux quantités ont été calculées en nombre de copies/g MS. L'indication «PIMA1 non détecté » indique les échantillons testés où la cible n'a pas été détectée.

Ils permettent d'observer l'évolution de l'indicateur de contamination fécale sur la filière et d'évaluer les étapes qui sont potentiellement hygiénisantes (fosse de stockage, séparation de phases et lagunage). Ces résultats confirment :

- 1) La faible proportion de cible dans les fèces.
- 2) L'accumulation de la cible dans la préfosse et la **fosse de stockage** en fonction du temps, ce qui ne correspond pas à l'hygiénisation attendue, surtout dans la fosse de stockage. Cette différence, par rapport aux connaissances antérieures, pourrait venir du fait que notre étude a été réalisée sur un système réel tandis que les études antérieures portaient sur des bâchés de lisier suivis hors site, sans apport continu de fèces.
- 3) La chute de 2 à 3 logs du rapport PIMA1/ADNr 16S totaux dans les sols épandus, probablement à cause de la dilution des micro-organismes du lisier dans la communauté microbienne du sol.
- 4) Les effets hygiénisants du lagunage et du compostage.

En conclusion, la fosse de stockage ne représente pas un système d'hygiénisation par rapport à la cible quantifiée. Par contre, le lagunage et le compostage montrent une efficacité d'hygiénisation de 2 ou 3 logs au cours de temps.

7.2.8. Vérification de l'absence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons d'origine solide

La présence d'inhibiteurs de PCR a été testée sur tous les échantillons solides de la filière et les sols car ils ont donné des résultats négatifs ou très variables pendant l'essai de quantification. Pour cela, une amplification a été réalisée pour chaque échantillon avec ou sans ajout d'un ADN contrôle (le standard 18). Les cinétiques d'amplification obtenues ont montré l'absence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons (**Fig. 7.8**). En effet, tous les échantillons ont montré une amplification correcte avec une quantité de cible voisine de celle du standard 18 seul. Le standard 18 a un Ct de 26 et tous les échantillons additionnés de standard ont eu le même Ct. Les échantillons sans ajout sont restés inférieurs à la limite de quantification, seulement l'échantillon de fèces a été détecté. Cet essai montre que la faible quantité de cible observée dans les échantillons solides et les sols n'a pas été causée par l'effet d'un inhibiteur de PCR.

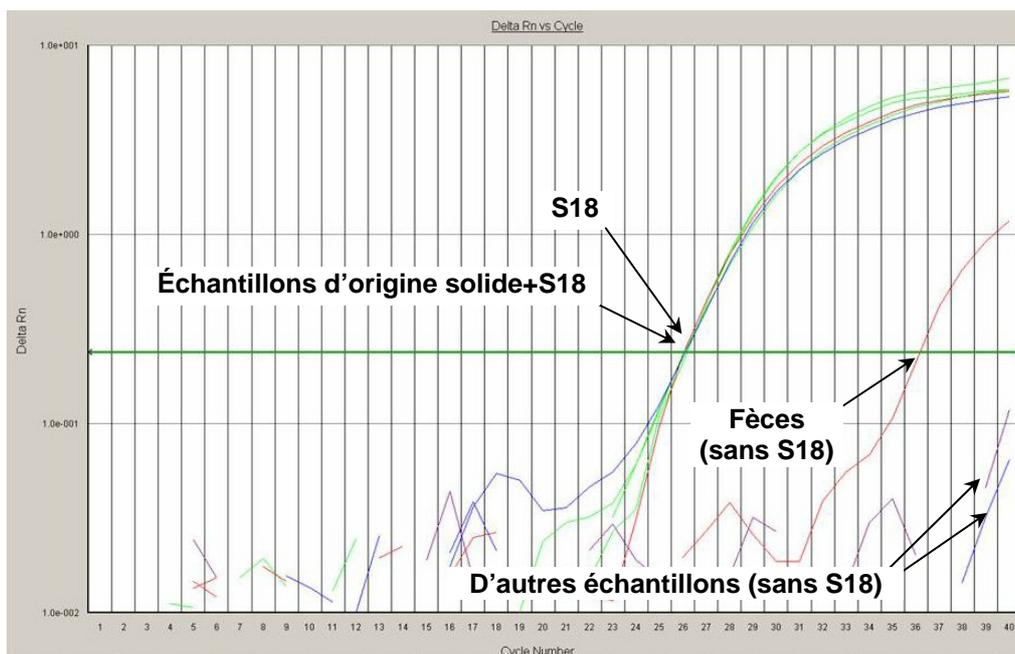


Figure 7.8. Contrôle des inhibiteurs sur la réaction PCRq des échantillons d'origine solide et les sols. Le nombre d'amplifications ou cycles est indiqué en abscisse. L'augmentation de la fluorescence détectée à chaque cycle s'indique en ordonnée.

7.2.9. Système de détection *Enterococcus*

Le système d'amorces et de sonde TaqMan publié par Frahm et Obst (2003) a été testé pour trois échantillons de la filière porcine de la même façon que pour le système PIMA1, mais en utilisant les réactifs et concentrations qui correspondent à la réaction PCRq de ce système de détection (voir **Tableau 4.7**).

La droite étalon réalisée à partir des standards a donné une efficacité d'amplification de 96 % pour un coefficient de corrélation de 0,999. **La limite de détection** a été estimée inférieure à **10 copies de gène cible** par réaction de PCR (volume de 25 μ L). **La gamme de détection** s'étend de 10 à 10^7 copies de gène cible par réaction de PCR.

7.2.9.1. Les essais de quantification absolue des *Enterococcus*

Les premiers échantillons testés (fèces, préfosse et fosse de stockage) ont montré une mauvaise répétabilité de la mesure avec des écarts types importants (**Tableau 7.8**). Même si l'efficacité de la réaction PCR a augmenté à 98 % dans cet essai, le

coefficient de corrélation a diminué à 0,991 en comparaison des essais de la droite étalon.

Tableau 7.8. Quantification par PCRq des *Enterococcus* (essai de quantification absolue). Le pourcentage correspond aux écarts type de l'ADN quantifié.

Echantillon	PCRq ^a	Comptage de colonies
Fèces (nombre de copies/g MS)		
05-mai-03	$3,8 \times 10^4 \pm 56 \%$	$3,8 \times 10^4$
02-juin-03	$8,6 \times 10^5 \pm 24 \%$	$1,2 \times 10^6$
Préfosse du bâtiment (nombre de copies/mL)		
25-nov-02	$1,2 \times 10^5 \pm 25 \%$	$1,6 \times 10^7$
02-juin-03	$4,2 \times 10^6 \pm 42 \%$	$2,0 \times 10^5$
05-Mai-03	$4,9 \times 10^6 \pm 29 \%$	$2,4 \times 10^6$
Fosse de stockage (nombre de copies/mL)		
25-nov-02	$3,3 \times 10^6 \pm 42 \%$	$2,8 \times 10^8$
10-mars-03	$6,7 \times 10^6 \pm 36 \%$	$1,3 \times 10^7$
02-juin-03	$9,2 \times 10^6 \pm 37 \%$	$1,1 \times 10^6$

a. Les calculs de la quantité de la cible sont présentés dans les **annexes : Tableau a7.3.**

Les causes probables de ces problèmes pourraient être :

- Une mauvaise hybridation de la sonde Taq-Man pendant la PCRq, ce phénomène n'a pas été observé avec la sonde Taq-Man/MGB du système PIMA1 car le tripeptide MGB aide à l'accrochage de la sonde.
- Une mauvaise spécificité des amorces sur nos échantillons complexes qui présentent une grande diversité par rapport aux essais réalisés par Frahm et Obst (2003). Une recherche *in silico* des cibles des amorces et de la sonde du système *Enterococcus* a montré que la sonde et l'amorce forward (avec un mésappariement) hybrident à *Lactobacillus acidophilus*. Ce *Lactobacillus* est présent dans l'inventaire du lisier. Il est difficile d'évaluer les risques de sa détection par le système puisque l'amorce reverse ne devrait pas permettre son amplification.
- Une conversation personnelle avec les techniciens d'Applied Biosystems a suggéré une possible contamination des réactions de PCR par de l'ADN étranger. L'ADN

d'*Enterococcus faecium* a en effet été utilisé pour d'autres manipulations dans notre laboratoire.

- Une erreur humaine pendant la réalisation des expériences, surtout pendant le pipetage des échantillons lors de la mise en marche des réactions de PCRq. Cette dernière hypothèse a été testée par comparaison d'une série de 4 amplifications préparées individuellement (comme d'habitude), avec 6 amplifications obtenues à partir d'un même mélange réactionnel réalisé avec une seule addition d'ADN (**Tableau 7.9**). Contrairement à notre hypothèse, les résultats ont montré un écart type supérieur pour les amplifications réalisées à partir du mélange par rapport à celles préparées individuellement. Des erreurs de pipetage ne sont donc pas la cause du fort écart type observé dans le système.

Tableau 7.9. Effet du pipetage sur la réaction de PCRq du système *Enterococcus* (essai de quantification absolue).

Echantillon	Quantité FINALE (nombre de copies / 5 mL) (n=6)	Ecart Type (%)	Quantité FINALE (nombre de copies / 5 mL) (n=4)	Ecart Type (%)
	Addition de l'échantillon sans pipetage		Addition de l'échantillon avec pipetage	
Fèces (1/100) 02-juin-03	4,8 x 10 ⁴	74	3,29 x 10 ⁴	26
Préfosse (1/100) 02-juin-03	2,6 x 10 ⁴	33	2,23 x 10 ⁴	18
Fosse de stockage (1/50) 25-nov-02	1,6 x 10 ⁵	52	2,08 x 10 ⁵	23

Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7.8** où les essais ont montré un nombre inférieur ou égal d'entérocoques mesurés par la PCRq comparativement aux numérations effectuées par culture. Ce résultat n'était pas attendu car les méthodes de culture ont des chiffres de représentativité d'un échantillon plus faibles que ceux obtenus par les méthodes moléculaires. On peut considérer les raisons suivantes :

- Une surestimation en culture de la quantité d'entérocoques ou une sous-estimation en utilisant la PCRq associée à la présence d'inhibiteurs.

- Les espèces d'entérocoques quantifiées par le système de PCR sont définies par la spécificité des oligomères utilisées. Donc, il est probable que les deux méthodes mesurent des populations d'entérocoques différentes qui ne sont pas comparables.
- Il est possible que la sous-représentativité des entérocoques soit liée à des biais des techniques moléculaires pendant les différentes étapes de manipulation de l'ADN qui auraient eu comme effet une dilution de molécules d'ADN moins abondantes comme celles d'entérocoques. Il ne faut pas oublier que les entérocoques n'ont pas été très abondants dans les inventaires microbiens sur lisier ou fumier.

7.3. Conclusion

Le nouveau système d'amorces et de sonde Taq-Man de type 3'-Minor Groove Binder (MGB) dessiné (PIMA1) a été appliqué aux échantillons d'une filière porcine pour la détection et la quantification par PCR quantitative d'un groupe microbien majoritaire dans le lisier et le fumier. Les ADNs ont été extraits et amplifiés à partir de six types de matrices différentes : fèces, lisier, fractions solide et liquide de lisier, et de deux types de sol. La limite de détection obtenue a été de 7,5 copies/réaction de PCR (25 µL de volume de réaction). Cependant, la limite de quantification, définie sur la base d'un écart type inférieur à 10 % dans les étalons et les ADN quantifiés, a été de 750 copies/réaction de PCR.

Seuls les échantillons de lisier ont eu une quantité de cible recherchée dans les limites de quantification. Cette quantité représente entre 0,01 et 0,5 % de l'ADNr 16S total. Les autres échantillons, détectés en dessous du seuil de quantification, ne présentaient pas de composés inhibiteurs de la réaction de PCR. La fosse de stockage ne représente pas un système d'hygiénisation par rapport à la cible quantifiée car son nombre dans la fosse augmente avec le temps. Par contre, le lagunage et le compostage des phases séparées du lisier semblent efficaces car le nombre de la cible diminue d'au moins 100 fois (2 log) avec le temps.

Le système de détection PIMA1 évalué représente une bonne méthode de détection et quantification pour les échantillons de l'environnement utilisés dans cette étude (**Tableau 7.10**). Le système de détection *Enterococcus* en revanche a présenté des problèmes de répétitivité qui ont compromis la comparaison envisagée avec les numérations culturales.

Tableau 7.10. Evaluation des systèmes testés par PCR quantitative.

	Système 16S Totaux	Système <i>Enterococcus</i>	Système PIMA1
Répétitivité (écart type)	3 - 51 %	21 - 56 %	< 10 % (limite de quantification)
Coefficient de corrélation	0,991 ou plus	0,991 ou plus	0,996 ou plus
Efficacité	94 - 100 %	90 - 100 %	96 - 100 %

Le **Tableau 7.10** montre les principaux paramètres des systèmes de détection utilisés dans cette étude. En général, le coefficient de corrélation et l'efficacité d'amplification ont été corrects dans tous les systèmes, mais la répétabilité n'est correcte que parmi les essais du système PIMA1. Cette différence pourrait être due à la meilleure spécificité de la sonde MGB comparée aux autres systèmes.

CONCLUSIONS GENERALES et PERSPECTIVES

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

En France, la gestion des lisiers et des fumiers de porcs doit prendre en compte des contraintes environnementales du fait de l'importance des volumes de déchets produits. Ils sont généralement épandus ou entreposés sur des terrains agricoles et servent d'engrais sur les champs de cultures. Des problèmes de pollution du sol, de l'eau et de l'air (problème d'odeur) liés à ces pratiques ont été bien établis. En Bretagne, une de région qui réunit un grand nombre d'exploitations intensives porcines, l'épandage du lisier a engendré un grave problème de contamination de l'eau à cause des nitrates. Cependant, l'analyse des composés polluants et du rôle de la communauté microbienne impliquée dans certaines transformations biochimiques a été très peu documentée, du fait notamment de limitations techniques.

Le projet « Porcherie verte » est une approche multi-échelles pour comprendre l'avenir des exploitations porcines, avec entre autres, la problématique des déchets porcins. Dans le cadre de ce projet, nous avons analysé la structure de la communauté bactérienne de lisiers et de fumiers de porcs en utilisant des outils moléculaires, et considéré l'implication de plusieurs transformations biochimiques liées aux activités microbiennes.

Comparaison des communautés procaryotes du lisier et de l'intestin de porc :

L'analyse de la structure de la communauté bactérienne du lisier de porcs (LPE) a montré une ressemblance très importante avec celle publiée par Leser *et al.*, (2002) sur le tractus gastro-intestinal du porc. La comparaison des deux inventaires permet de mettre en évidence les similarités entre ces deux écosystèmes.

La comparaison des communautés bactériennes de LPE et de tube digestif porcin montre que tous les groupes bactériens principaux du lisier sont déjà présents dans le tube digestif du porc (**Fig. A**). Les groupes phylogénétiques les plus divers et les plus abondants dans les deux écosystèmes sont le groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* et les groupes Gram positif à bas GC% avec *Eubacterium* et apparentés,

Clostridium et apparentés et la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*. La similitude des deux écosystèmes est renforcée par l'abondance de certains phylotypes. Ainsi, les phylotypes liés à *S. alactolyticus* et à *L. reuteri* sont très majoritaires dans les deux écosystèmes.

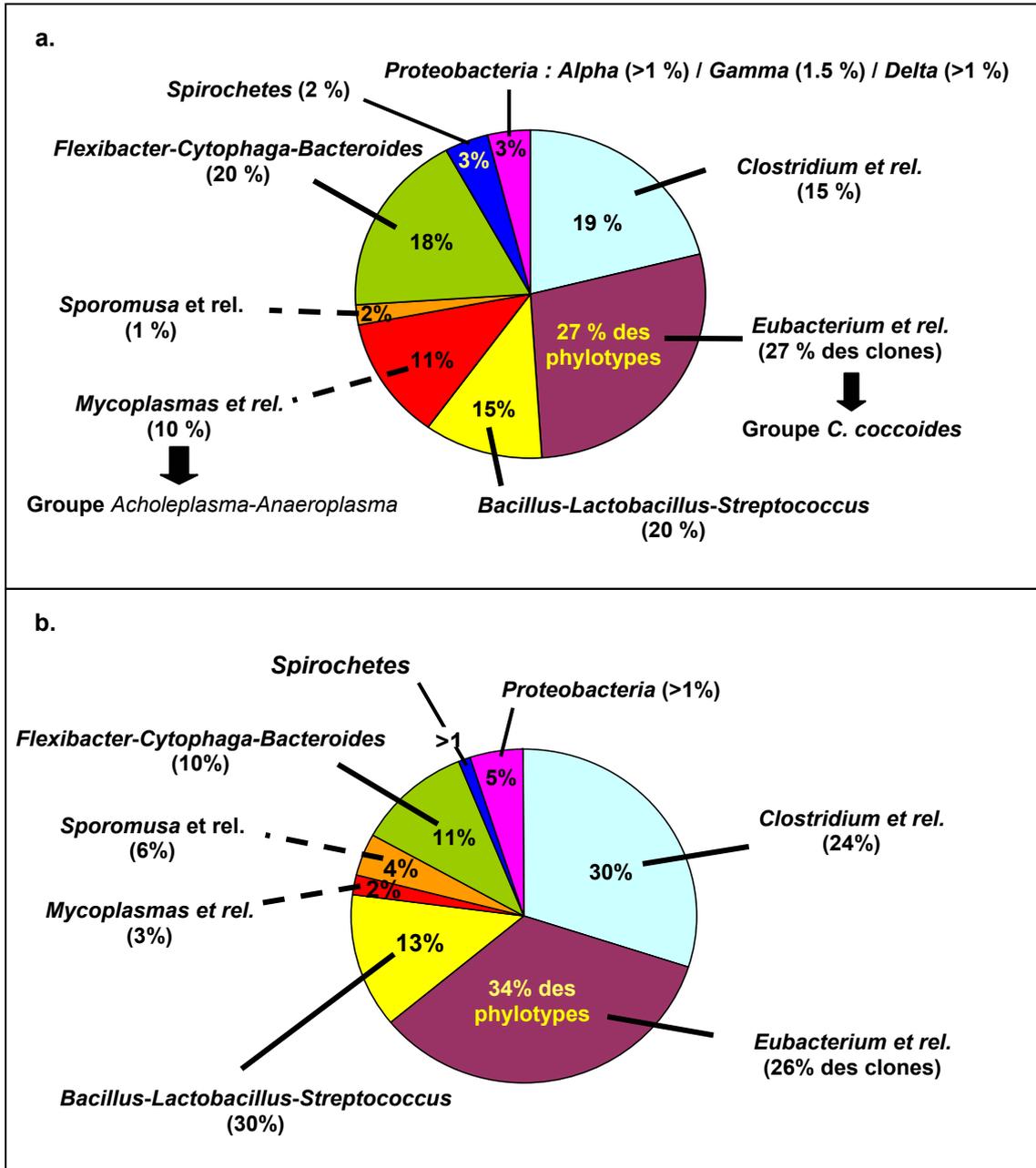


Figure A. Comparaison entre les groupes bactériens trouvés dans le LPE (a) et ceux trouvés par Leser *et al.*, (2002) dans le TGP (b). Le pourcentage au dessous du nom de groupe indique l'abondance et celui dans le graphique correspond à la diversité. Les lignes en pointillés montrent les groupes pour lesquels la diversité et l'abondance du LPE et du TGP sont différentes. Les noms des groupes correspondent à ceux du Ribosomal Database Project II (Maidak *et al.*, 2001).

Des différences apparaissent toutefois entre les deux écosystèmes :

- Les deux écosystèmes diffèrent par le nombre plus élevé dans le lisier de séquences affiliées aux groupes *C. purinolyticum*, *Mycoplasma* et apparentés et *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*. Une comparaison plus fine au sein de chaque groupe montre que plusieurs phylotypes du tube digestif sont clairement sous représentés dans le lisier.
- Il faut remarquer le sous-groupe *C. purinolyticum* qui présente la particularité d'être sur-représenté dans le lisier comparativement au tube digestif porcin, ainsi que les *Clostridium* et apparentés (*C. leptum* et *C. botulinum*) qui sont très proches de phylotypes du tube digestif porcin (12/21 phylotypes). Cette similitude peut indiquer une possible résistance ou une adaptation de ce groupe aux changements de l'environnement. Néanmoins, l'abondance de ces phylotypes est très faible (un seul clone obtenu).
- Dans les deux écosystèmes, les phylotypes les plus abondants sont affiliés aux *Lactobacilli* et aux *Streptococci*, notamment *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonni*, *L. amylovorus* et *Streptococcus alactolyticus*. Ces espèces, qui ont été observées à la surface de la paroi du colon, représentent 54 % de la flore cultivable de l'intestin de porc (Pryde *et al.*, 1999). *L. johnsonni* et *L. reuteri* sont régulièrement utilisés comme probiotiques pour aider à l'établissement d'une flore correcte dès les premiers jours de vie des porcelets et pendant le reste de la vie du porc (Tannock, 1990 ; Ducluzeau et Raibaud, 1994 ; Gournier-Chateau, 1994 ; Henriksson *et al.*, 1995 ; Simpson *et al.*, 2000).
- Les *Mycoplasmas* et apparentés sont apparus très divers et sur-représentés dans le lisier comparativement au tube digestif porcin. De plus, la majorité des phylotypes du lisier sont apparentés à des espèces connues du sous-groupe *Acholeplasma-Anaeroplasma* alors que dans le tube digestif ils appartiennent en majorité au sous-groupe *Eubacterium cylindroides*.
- La diversité et l'abondance des *Sporomusa* et apparentés dans le tube digestif porcin sont beaucoup plus grandes que celles observées dans le lisier de porcs. Ce groupe contient plusieurs espèces acétogènes cultivées. Sa faible diversité dans le lisier pourrait résulter d'un phénomène d'inhibition due à l'absence (ou la faible abondance) d'organismes acétotrophes dans le lisier (*Archaea* méthanogènes ou

bactéries sulfato-réductrices) qui peut conduire à la rupture des relations syntrophiques présentes dans les systèmes anaérobies méthanogéniques.

- Le groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* est plus représenté dans le lisier que dans le tube digestif porcin. Cette différence est essentiellement liée à la présence de plusieurs phylotypes abondants du lisier dans les sous-groupes *Bacteroides fragilis* et *Porphyromonas macacae* qui étaient peu représentés dans le tube digestif où les phylotypes dominants appartenaient aux sous-groupes de *Prevotella* et au sous-groupe *Rikenella microfus*.

Comparaison des communautés procaryotes du lisier et de fumier porcins :

Le fumier de porcs représente un écosystème micro-aérobie où la communauté microbienne anaérobie typique des environnements intestinaux apportée par les fèces subit des changements, notamment plusieurs groupes affiliés aux bactéries Gram positif bas GC% tels que *C. coccoides*, *C. leptum*, *Sporomusa* et apparentés, et le groupe *Prevotella*. Ces groupes ont été nombreux dans le lisier et la chute de leur représentativité est probablement due aux nouvelles conditions aérobies. Les populations qui vont émerger sont des nitrifiants autotrophes et hétérotrophes des groupes *beta* et *gamma* affiliés aux Proteobacteria, des *Bacteroides* et de nouveaux groupes non affiliés (**Fig. B**).

Dans le fumier, tous les groupes de bactéries Gram positif à part les *Mycoplasmas* et apparentés, ont vu leur diversité et abondance réduites. Ces groupes anaérobies typiques de l'intestin du porc n'ont pas résisté au changement environnemental qui se produit lors de la formation du fumier en conditions aérobies.

L'augmentation des phylotypes affiliés aux groupes *Proteobacteria* nitrifiants autotrophes et hétérotrophes confirme l'apparition des conditions aérobies dans le fumier car ils utilisent l'oxygène moléculaire pour réaliser la nitrification. Les nitrifiants appartiennent aux groupes *alpha*, *béta* et *gamma*. La présence du groupe *béta* a été observée dans un réacteur qui fait la nitrification en utilisant les eaux résiduelles d'une porcherie (Kim *et al.*, 2004).

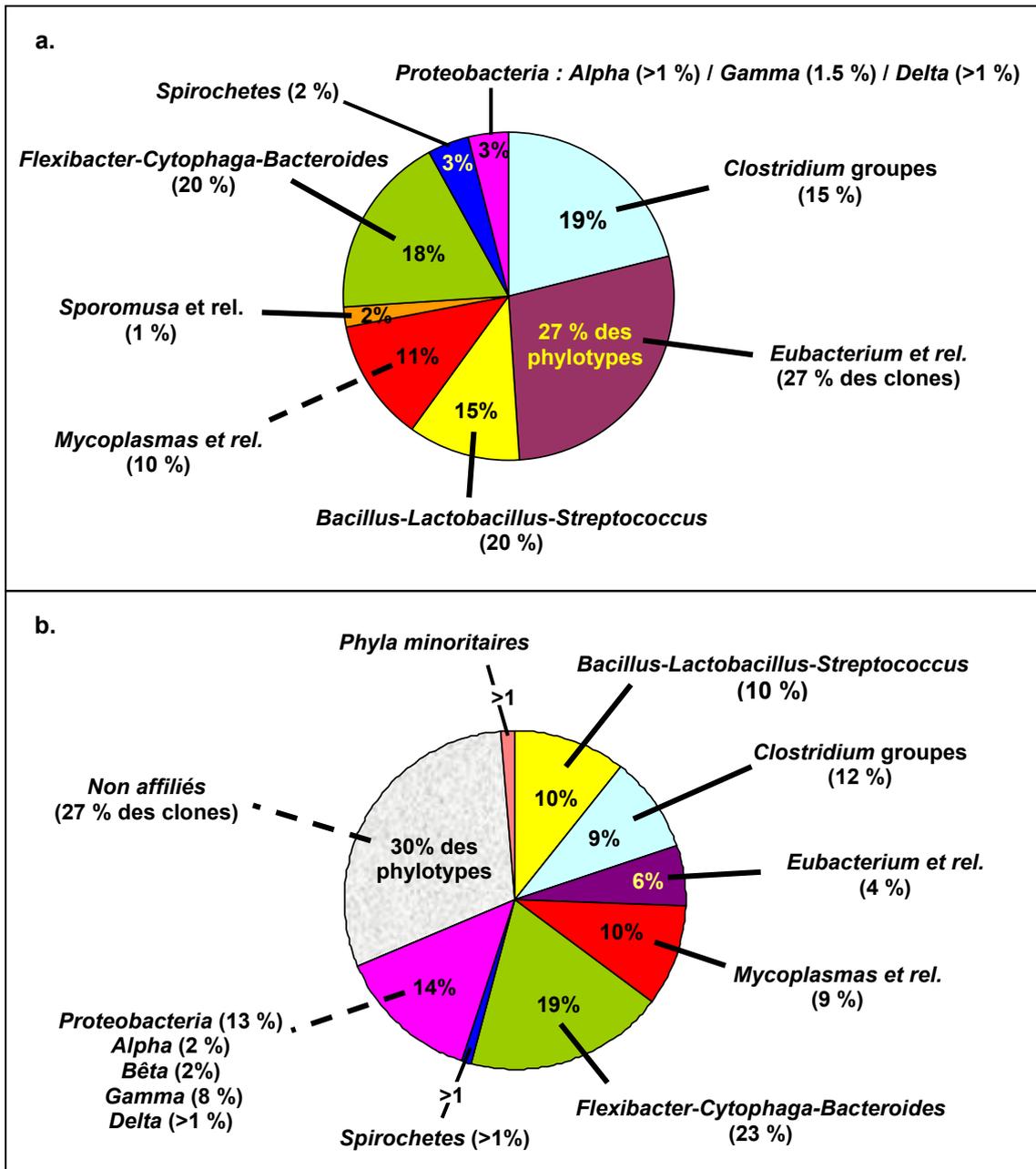


Figure B. Comparaison entre les groupes bactériens trouvés dans le LPE (a) et ceux trouvés dans le fumier de porcs (b). Le pourcentage au dessous du nom de groupe indique l'abondance et celui dans le graphique correspond à la diversité. Les lignes en pointillés montrent les groupes pour lesquels la diversité et l'abondance du LPE et du fumier sont différentes. Les noms des groupes correspondent à ceux du Ribosomal Database Project II (Maidak *et al.*, 2001).

L'observation la plus frappante a été la grande diversité de groupes non affiliés aux phyla connus qui dominent les banques génomiques des fumiers. Aucun phylotype de lisier ou du tractus intestinal de porc n'est proche de ces groupes, donc il s'agit

probablement de groupes aérobies hétérotrophes qui sont normalement présents pendant le début du compostage des fumiers de porcs.

Les transformations biochimiques dans le lisier et le fumier :

La comparaison des contraintes environnementales entre le lisier et le fumier de porcs, montre que c'est le lisier qui pose problème, le fumier étant jugé comme un déchet non polluant avec des caractéristiques d'innocuité microbiologique. Nous avons fait l'analyse physico-chimique de ces déchets et obtenu les résultats suivants :

- Le stockage du lisier dans la préfosse est une source de production de molécules malodorantes, surtout des AGV, leurs concentrations pouvant être très importantes et empêcher leur biodégradation par la chaîne trophique à cause de certains effets d'inhibition cités dans la littérature (Koster et Koomen, 1988 ; Aguilar *et al.*, 1995 ; Speece, 1996).
- Le lisier est connu comme un déchet polluant car l'ammoniac, présent en forte concentration, peut être oxydé en nitrates par les populations bactériennes nitrifiantes présentes dans le sol ou même dans le lisier, et ainsi polluer les aquifères. Dans le fumier, la nitrification semble devenir très active, et la concentration en nitrates est élevée. La concentration d'ammoniac diminue, et est inférieure à celle du lisier. Cependant, si les populations dénitrifiantes trouvées dans le fumier ne réalisent pas la dénitrification complète, les activités d'entreposage sur des terrains agricoles peuvent contribuer à la pollution des aquifères par les nitrates.
- Les fortes concentrations en carbone, azote et phosphore dans le lisier empêchent la mise en oeuvre d'un traitement anaérobie efficace car elles excèdent toutes les limites pour le fonctionnement correct d'un réacteur. La séparation des phases du lisier peut cependant aider à résoudre ce problème.

Suivi d'un indicateur de contamination fécale commun du lisier et du fumier.

Après d'avoir décrit les structures des communautés microbiennes du lisier et du fumier de porcs, nous avons réalisé le suivi d'un nouvel indicateur de contamination fécale porcine à partir d'un système de détection par PCR en temps réel formé par un couple d'amorces et une sonde de type TaqMan-MGB. Ce système de détection a été dessiné à partir d'un groupe affilié au phylotype PIMALC07 et PILALG12 qui représentaient respectivement 5 % et 3 % des clones des inventaires moléculaires de lisier et de fumier. Ces phylotypes ont été groupés phylogénétiquement avec des

séquences obtenues d'une fosse de stockage de lisier, du tractus intestinal de porc et de l'espèce *Streptococcus alactolyticus* à l'intérieur de la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*.

Le système de détection dessiné (nommé PIMA1) a été appliqué aux échantillons d'une filière porcine pour la détection et la quantification des séquences de l'ADNr 16S phylogénétiquement apparentées au clone majoritaire PIMALC07. Cette filière correspond à six types d'échantillons avec différentes matrices : fèces, lisier, fractions solide et liquide de lisier, et de deux types de sol. Les résultats ont été évalués par rapport aux trois traitements d'hygiénisation que possède la filière :

- Le nombre de copies de la cible augmente pendant le stockage du lisier en fosse.
- Le nombre de copies de la cible diminue pendant le lagunage et le compostage de la fraction solide.
- Les résultats sur la filière sont en accord avec :
 - Les quantifications des Entérocoques réalisées sur les fèces, préfosse et fosse de stockage avec le système de détection PCRq de (Frahm et Obst, 2003).
 - Les observations sur *E. coli* O157 de Chambers *et al.* (2001).
 - Les numérations en culture des Entérocoques et des coliformes totaux sur les mêmes échantillons (réalisées par l'École vétérinaire de Toulouse).

En conclusion, le système de détection PIMA1 évalué représente une bonne méthode de détection et de quantification pour les échantillons de l'environnement utilisés dans cette étude. Mais plusieurs tests restent à réaliser...

Les perspectives à suivre :

Les perspectives techniques sont les suivantes :

- Tester d'autres échantillons environnementaux de différentes déjections animales et d'autres écosystèmes non intestinaux dans le but de confirmer la spécificité du système de détection PIMA1.
- Réaliser une droite étalon en utilisant par exemple un échantillon qui a donné un résultat négatif pour le système PIMA1 (sol) pour vérifier l'efficacité et le coefficient de corrélation, en présence des inhibiteurs de la matrice « sol ».
- Dans le groupe des *Eubacterium* et apparentés, cinq phylotypes qui forment le groupe le plus abondant du sous-groupe *C. coccoïdes* sont proches de *C. phytofermentans* et d'un clone isolé du sol. Le phylotype PIMALC197, qui appartient à ce groupe a été choisi pour développer un système de détection TaqMan-MGB

par PCR en temps réel. Ce système a été vérifié *in silico* et les premiers essais en PCR normale ont permis de détecter la cible dans un échantillon du lisier de la préfosse. Il reste donc à réaliser les essais de détection et de quantification en PCR en temps réel.

Les perspectives scientifiques sont les suivantes :

- Les connaissances de la communauté microbienne de lisier et fumier, ainsi que de leurs milieux, pourront être utilisées comme point de départ d'études sur l'impact environnemental de ces déjections lié aux micro-organismes (odeurs, production de méthane, cycle de l'azote et gènes de pathogénicité), leur réglementation et leur gestion (traitement).
- Les inventaires obtenus dans cette étude pourront être utilisés pour le développement de sondes pour la détection de groupes microbiens producteurs de composés malodorants du lisier et nitrifiants du fumier.
- La fonction du groupe de séquences *Archaea* non cultivées affiliés à CA11 est un sujet d'intérêt pour la recherche, car au sein du domaine *Archaea*, les méthanogènes ne forment pas un groupe monophylétique. Donc, la recherche des conditions de culture pour les espèces correspondantes et *a posteriori*, l'étude de leurs physiologies est une perspective à envisager.
- Trois clusters de séquences bactériens du fumier non cultivés ont été mis en évidence, leur fonction dans l'écosystème reste à déterminer.
- Concernant la pollution par les nitrates due au lisier et au fumier, la recherche doit envisager l'étude de l'élimination de l'azote ammoniacal comme un traitement préalable à l'utilisation de ces déchets sur des terrains agricoles.
- La recherche sur le traitement des lisiers peut être dirigée du côté de la digestion anaérobie du lisier stocké pour valoriser le biogaz produit, ou du côté d'un procédé aérobie pour éliminer les problèmes liés aux odeurs produites en anaérobiose.

Notre étude a été menée avec le but de mieux comprendre l'origine des problèmes de pollution associés aux micro-organismes contenus dans les déchets porcins. L'analyse de la structure de la communauté microbienne, parallèlement à la présence de métabolites clés qui sont produits par les groupes microbiens étudiés, reste un outil limité pour comprendre les fonctions des populations dans ces écosystèmes.

- Cette thèse constitue une des premières études sur l'écologie microbienne des déchets porcins. Elle représente le premier inventaire moléculaire qui a été fait sur les fumiers de porc, ainsi que le plus complet réalisé pour le lisier de porc.

- Cette étude apporte des conclusions qui vont permettre d'améliorer la compréhension de ces écosystèmes particuliers afin de trouver des solutions aux problèmes que pose leur gestion, ainsi que les bases d'un système de détection d'un indicateur de contamination fécale porcine appliqué aux échantillons environnementaux. Ce système est un des premiers à quantifier par PCR en temps réel ce type d'échantillon.

REFERENCES

REFERENCES

- Abe, N., M. Nagoshi, K. Takami, Y. Sawano et H. Yoshikawa** (2002). A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Veterinary Parasitology* **106**: 203-212.
- Agriculture et Agroalimentaire, C.** (2003). http://res2.agr.gc.ca/publications/ha/4a3_f.htm
- Aguilar, A., C. Casas et J.M. Lema** (1995). Degradation of volatile fatty acids by differently enriched methanogenic cultures: kinetics and inhibition. *Wat Res* **29**(2): 505-509.
- Allison, M.J.** (1978). Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **35**(5): 872-877.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller et D.J. Lipman** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Amann, R.I., W. Ludwig et K.H. Schleifer** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**(1): 143-169.
- APHA, AWWA et WPCF** (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C., American Public Health Association.
- Attwood, G.T., A.V. Klieve, D. Ouwkerk et B.K.C. Patel** (1998). Ammonia-Hyperproducing Bacteria from New Zealand Ruminants. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1796-1804.
- Aubry-Damon, H., K. Grenet, P. Sall-Ndiaye, D. Che, E. Cordeiro, M.E. Bognoux, E. Rigaud, Y. Le Strat, V. Lemanissier, L. Armand-Lefèvre, D. Delzescaux, J.C. Desenclos, M. Liénard et A. Andremont** (2004). Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerging Infectious Diseases* **10**(5): 873-879.
- Baker, L.A.** (1998). Design considerations and applications for wetland treatment of high-nitrate waters. *Water Science and Technology* **38**(1): 389-395.
- Barcenilla, A., S.E. Pryde, J.C. Martin, S.H. Duncan, C.S. Stewart, C. Henderson et H.J. Flint** (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **66**(4): 1654-1661.
- Barns, S.M., C.F. Delwiche, J.D. Palmer et N.R. Pace** (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 9188 - 9193.
- Beaty, P.S. et M.J. McInerney** (1989). Effects of organic acid anions on the growth and metabolism of *Syntrophomonas wolfei* in pure culture and in defined consortia. *Appl Environ Microbiol* **55**: 977-983.
- Béline, F.** (2001a). Caractéristiques des lisiers et méthodes d'analyse. Le traitement biologique aérobie du lisier de porc : Les transformations de l'azote et les émissions gazeuses polluantes. F. LACROIX. Antony, France, CEMAGREF Editions: 19-32.

- Béline, F.** (2001b). Descriptions des principaux processus de transformation de l'azote. Le traitement biologique aérobie du lisier de porc : Les transformations de l'azote et les émissions gazeuses polluantes. F. LACROIX. Antony, France, CEMAGREF Editions: 33-60.
- Béline, F., J. Martinez, D. Chadwick, F. Guiziu et C.M. Coste** (1999). Factors affecting nitrogen transformations and related nitrous oxide emissions from aerobically treated piggery slurry. *J. Agric. Engng Res.* **73**: 235-243.
- Béline, F., J. Martinez et C.H. Burton** (1998a). Traitement aérobie du lisier de porcs. Bases théoriques et techniques. *Vecteur Environnement* **31**(2): 38-48.
- Béline, F., J. Martinez, C. Marol et G. Guiraud** (1998b). Nitrogen transformations during anaerobically stored ¹⁵N-labelled pig slurry. *Bioresource Technology* **64**: 83-88.
- Belli-Filho, P. et G. Martin** (1996). Procédé de réduction des odeurs d'un lisier stocké en fosse couverte. *Journées de la Recherche Porcine en France* **28**: 225-230.
- Bergey, D.H.** (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Baltimore LTD.
- Bernard, C.R. et M. Heduit** (1979). Evolution du lisier de porcs au cours du stockage. *Journées Rech Porcine en France*: 177-184.
- Bernet, N.** (2004). Communication personnelle. bernet@ensam.inra.fr.
- Bernet, N., J.P. Delgenès et R. Moletta** (2000). Lisier de porc: la solution biologique. *Biofutur* **197**: 42-45.
- Bisaillon, J.G., R. Beaudet, M. Sylvestre, M. Ishaque, A. Morin, E. Di Franco et A.M. Guérin** (1984). Aspects microbiologiques du lisier de porc. *Sciences et Techniques de l'Eau* **17**: 397-400.
- Bothe, H., G. Jost, M. Schlöter, B.B. Ward et K.P. Witzel** (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev* **24**(5): 673-690.
- Bourque, D., J.G. Bisaillon, R. Beaudet, M. Sylvestre, M. Ishaque et A. Morin** (1987). Microbial degradation of malodorous substances of swine waste under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* **53**: 137-141.
- Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter et H.F. Noller** (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **148**: 107-127.
- Buijsman, E., H.F.M. Maas et W.A.H. Asman** (1987). Anthropogenic NH₃ Emissions in Europe. *Atmospheric Environment* **21**(5): 1009-1022.
- Bull, A.T., A.C. Ward et M. Goodfellow** (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Rev* **64**(3): 573-606.
- Burton, C.H.** (1999). Stratégies de traitement des effluents d'élevage. Comment concilier production porcine et protection de l'environnement, CEMAGREF Editions. Paris.
- Burton, C.H. et C. Turner** (2003). *Manure management*. Silsoe Research Institute. Bedford, UK.

- Butine, T.J. et J.A. Leedle** (1989). Enumeration of selected anaerobic bacterial groups in cecal and colonic contents of growing-finishing pigs. *Appl Environ Microbiol* **55**(5): 1112-1116.
- C.S.H.P.F.** (2003). <http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/cs1213.htm>
- Campbell, A.J., A.J. MacLeod et C.S. Stewart** (1997). Nutrient characterization of stored liquid hog manure. *Canadian Agricultural Engineering* **39**(1): 43-48.
- Centre de Référence Statistique, C.** (2001). www.statcan.ca/english/Pgdb/econ106a.htm
- Chambers, B.J., S. Groves et M. Hutchinson** (2001). Prevalences and survival of *E. coli* O157 in farm manures. *Pathogens in agriculture and the environment*, London.
- Chan, D.K.O., D. Chaw et C.Y.Y. Lo** (1994). Management of the sawdust litter in the 'pig-on-litter' system of pig waste treatment. *Resources, Conservation and Recycling* **11**(1-4): 51-72.
- Christen, R. et R. Ruimy** (1996). Application des méthodes moléculaires en évolution et écologie bactérienne. *Bull Soc Fr Microbiol* **11**: 25-32.
- Chuzhao, L. et T.L. Miller** (1998). Phylogenetic analysis of *Methanobrevibacter* isolated from feces of humans and other animals. *Arc Microbiol* **169**: 397-403.
- Clancy, P.B., N. Venkataraman et L.R. Lynd** (1992). Biochemical inhibition of sulfate reduction in batch and continuous anaerobic digesters. *Wat Sci Technol* **25**(7): 51-60.
- Clanton, C.J. et D.R. Schmidt** (2000). Sulfur compounds in gases emitted from stored manure. *Transaction of the ASAE* **43**(3): 1229-1239.
- Clicquot, C.** (2000). Eliminer le lisier : des solutions existent. *Environnement Magazine* (1585): 39-43.
- Coillard, J.** (1996). Différents modes de traitement de l'azote dans les effluents concentrés. Cas des effluents d'élevage. Application au lisier de porc. Traitement de l'azote. Cas des eaux résiduaires urbaines et des lisiers, Lyon.
- Coillard, J.** (1999). Avenir et perspectives de recherches sur les techniques de traitement des lisiers de porc. Comment concilier production porcine et protection de l'environnement, CEMAGREF Editions. Paris.
- Coillard, J. et C. Texier** (1994). Le traitement à la ferme des lisiers de porcs excédentaires. Une étude de cas, l'unité de traitement de la Coopérative Agricole Lauragaise. *Journées de la Recherche Porcine en France* **26**: 141-150.
- Colberg, P.J.** (1988). Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. A.J.B. ZEHNDER. New York, John Wiley & Sons: 333-372.
- Cooper, P. et I.S. Cornforth** (1978). Volatile fatty acids in stored animal slurry. *J. Sci. Fd Agric.* **29**: 19-27.
- Cotta, M.A., T.R. Whitehead et R.L. Zeltwanger** (2003). Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environ Microbiol* **5**(9): 737-745.

- Cummings, J.H., E.W. Pomare, W.J. Branch, C.P. Naylor et G.T. Macfarlane** (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic, and venous blood. *Gut* **28**: 1221-1227.
- Dojka, M.A., P. Hugenholtz, S.K. Haack et N.R. Pace** (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon - and chlorinated - solvent - contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **64**(10): 3869-3877.
- Dolfing, J.** (1988). Acetogenesis. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. A.J.B. ZEHNDER. New York, John Wiley & Sons: 417-468.
- Doré, J., B. Morvan, F. Rieu-Lesme, I. Goderel, P. Gouet et P. Pochart** (1995). Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS Microbiol Letters* **130**: 7-12.
- Drake, H.L.** (1994). Acetogenesis. Chapman and Hall Publishers. New York.
- Ducluzeau, R.** (1997). Composition and role of the flora of the digestive tract by human beings and domestic animals. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France* **83**: 71-80.
- Ducluzeau, R. et P. Raibaud** (1994). Ecologie microbienne du tube digestif et modes d'action des probiotiques en nutrition animale. *Cahiers d'etudes et de recherche francophones agricultures* **3**: 353-360.
- Eden** (2000). Généralisation de la couverture étanche des fosses à lisier avec valorisation du biogaz produit en France et en Catalogne. Région Midi Pyrénées, Conseil régional de Midi Pyrénées: 1-61.
- Edgcomb, V.P., D.T. Kysela, A. Teske, A.V. Gomez et M.L. Sogin** (2002). Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 7658-7662.
- Eklind, Y. et H. Kirchmann** (2000). Composting and storage of organic household waste with different litter amendments. II: nitrogen turnover and losses. *Bioresource Technology* **74**(2): 125-133.
- Eurostat** (1998). www.defra.gov.uk/farm/agenttwo/strategy/annex1.pdf
- Felsenstein, J.** (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368-376.
- Finlay, B.J. et T. Fenchel** (1991). An anaerobic protozoon, with symbiotic methanogens, living in municipal landfill material. *FEMS Microbiol Letters* **85**(2): 169-179.
- Fitch, W.M.** (1971). Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406-416.
- Fitch, W.M. et E. Margoliash** (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**: 279-284.
- Frahm, E. et U. Obst** (2003). Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* **52**: 123-131.

- Friedrich, M.W., D. Schmitt-Wagner, T. Lueders et A. Brune** (2001). Axial differences in community structure of *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4880-4890.
- Fuller, R., P.A. Barrow et B.E. Brooker** (1978). Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl Environ Microbiol* **35**(3): 582-591.
- Garcia, J.L., B.K.C. Patel et B. Ollivier** (2000). Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**(4): 205-226.
- Germon, J.C., Y. Couton et L. Senez** (1999). Epuration des effluents porcins par épandage : Efficacité et prise en compte de l'évolution des effluents au cours du stockage. Comment concilier production porcine et protection de l'environnement, CEMAGREF Editions. Paris.
- Godon, J.J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit et R. Moletta** (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**(7): 2802-13.
- Golyshina, O.V., T.A. Pivovarova, G.I. Karavaiko, T.F. Kondrat'eva, E.R.V. Moore, W.R. Abraham, H. Lünsdorf, K.N. Timmis, M.M. Yakimov et P.N. Golyshin** (2000). *Ferroplasma acidophilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmataceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the archaea. *Int J Sys Evol Microbiol* **22**: 421-437.
- Good, I.J.** (1953). The populations frequencies of species and the estimations of populations parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.
- Gournier-Chateau, N.** (1994). Les probiotiques pour les porcs. Les probiotiques en alimentation animale et humain. N. GOURNIER-CHATEAU, J.P. LARPENT, M.I. CASTELLANOS and L. J.L. Paris, Technique et Documentation-Lavosier: 153-161.
- Grady, C.P.L., G.T. Daigger et H.C. Lim** (1999). Biological wastewater treatment. Dekker, M. Inc. New York.
- Guingand, N.** (1999). Nuisances olfactives : de la porcherie à l'épandage. Comment concilier production porcine et protection de l'environnement. CEMAGREF Editions. Paris.
- Hackstein, J.H.P., A. Akhmanova, B. Boxma, H.R. Harhangi et F.G.J. Voncken** (1999). Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends in Microbiology* **7**(11): 441-447.
- Hamano, T., Y. Oka et T. Asano** (1972). Test of the malodor composition in the feces of domestic animals. *Bull Hyogo Prefect Exp Stn Anim Husbandry* **9**: 140-145.
- Hao, O.J.** (2000). Metal effects on sulfur cycle bacteria and metal removal by sulfate reducing bacteria. Environmental technologies to treat sulfur pollution. P.N.L. LENS and L. HULSHOFF-POL. London, IWA publishing: 393-414.
- Haque, R., I.K.M. Ali, C.G. Clark et W.A. Petri Jr.** (1998). A case report of *Entamoeba moshkouskii* infection in a Bangladeshi child. *Parasitology International* **47**: 201-202.
- Hartog, D.** (1992). Towards integrated pig production in the Netherlands. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **4**: 315-325.

- Hartung, J. et V.R. Phillips** (1994). Control of gaseous emissions from livestock building and manure stores. *J. Agric. Res.* **57**: 173-189.
- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak et P.M. Williams** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994.
- Henriksson, A., L. André et P. Conway** (1995). Distribution of lactobacilli in the porcine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol* **16**: 55-60.
- Henze, M. et P. Harremoës** (1983). Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - a literature review. *Wat Sci Technol* **15**: 1-101.
- Hobbs, P.J., T.H. Misselbrook et B.F. Pain** (1997). Characterisation of odorous compounds and emissions from slurries produced from weaner pig fed dry feed and liquid diets. *J. Sci Food Agric* **73**: 437-445.
- Hobson, P.N. et B.G. Shaw** (1974). The bacterial population of piggery waste anaerobic digesters. *Wat Res* **8**: 507-516.
- Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson et D.H. Gelfand** (1991). Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5' 3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 7276-7280.
- Hongoh, Y., M. Ohkuma et T. Kudo** (In press). Molecular analysis on bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol Ecol* **In Press**.
- Huang, G.F., J.W.C. Wong, Q.T. Wu et B.B. Nagar** (2004). Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Management* **In Press**.
- Hugenholtz, P., B.M. Goebel et N.R. Pace** (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**(18): 4765-4774.
- Hughes, M.N. et R.K. Poole** (1989). *Metals and micro-organism*. Chapman and Hall. New York.
- Iannotti, E.L., J.R. Fischer et D.M. Sievers** (1982). Characterization of bacteria from swine manure digester. *Appl Environ Microbiol* **43**(1): 136-143.
- Jackson, B.E. et M.J. McInerney** (2002). Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. *Letters to Nature* **415**: 454-456.
- Jin, P.K., S.K. Bhattacharya, C.J. Williams et H.N. Zhang** (1998). Effects of sulfide addition on copper inhibition in methanogenic systems. *Wat Res* **32**(4): 977-988.
- Johansen, T., C.R. Carlson et A.B. Kolsto** (1996). Variable numbers of rRNA gene operons in *Bacillus cereus* strains. *FEMS Microbiol Letters* **136**(3): 325-328.
- Jongbloed, A.W. et N.P. Lenis** (1998). Environmental concerns about animal manure. *J. Anim. Sci.* **76**: 2641-2648.
- Jukes, T.H. et C.R. Cantor** (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*. H.N. MUNRO. New York, Academic Press: 21-132.

- Karhadkar, P.P., J.M. Audic, G.M. Faup et P. Khanna** (1987). Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Wat Res* **21**: 1061-1066.
- Kenworthy, R.** (1973). Intestinal microbial flora of pig. *Advances in Applied Microbiology* **16**: 31-54.
- Killham, K.** (1986). Heterotrophic nitrification. *Nitrification*. J.I. PROSSER. Oxford, England, IRL Press for the Society for General Microbiology. **20**: 117-126.
- Kim, D.J., T.K. Kim, E.J. Choi, W.C. Park, T.H. Kim, D.H. Ahn, Z. Yuan, L. Blackall et J. Keller** (2004). Fluorescence in situ hybridization analysis of nitrifiers in piggery wastewater treatment reactors. *Wat Sci Technol* **49**(5-6): 333-340.
- Kleerebezem, R. et J.M. Stams** (2000). Kinetics of syntrophic cultures: A theoretical treatise on butyrate fermentation. *Biotech Bioeng* **67**: 529-543.
- Koster, I.W. et G. Lettinga** (1988a). Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biological Wastes* **25**: 51-59.
- Koster, I.W. et E. Koomen** (1988b). Ammonia inhibition of the maximum growth rate (μ_m) of hydrogenotrophic methanogens at various pH-levels and temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol* **28**: 500-505.
- Koster, I.W., A. Rinzema, A.L. De Vegt et G. Lettinga** (1986a). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. *Wat Res* **20**(12): 1561-1567.
- Koster, I.W.** (1986b). Characteristics of the pH-influenced adaptation of methanogenic sludge to ammonium toxicity. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **36**: 445-455.
- Koster, I.W. et G. Lettinga** (1984). The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agricultural Wastes* **9**: 205-216.
- Kroeker, E.J., D.D. Schulte, A.B. Sparling et H.M. Lapp** (1979). Anaerobic treatment process stability. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **51**(4): 718-727.
- kutyavin, I.V., I.A. Afonina, A. Mills, V.V. Gorn, E.A. Lukhtanov, E.S. Belousov, M.J. Singer, D.K. Walburger, S.G. Lokhov, A.A. Gall, R. Dempsy, M.W. Reed, R.B. Meyer et J. Hedgpeth** (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* **8**(2): 655-661.
- Kuwardina, O.N., B.S. Leander, V.V. Aleshin, A.P. Myl'nicov, P.J. Keeling et T.G. Simdyanov** (2002). The phylogeny of Colpodellids (Alveolata) using small subunit rRAN gene sequences suggests they are the free-living sister group to Apicomplexans. *J Eukaryot Microbiol* **49**(6): 498-504.
- Laferrière, M.** (1996). L'industrie porcine et les risques reliés à la santé humaine. *Vecteur Environnement* **29**(3): 27-31.
- Le Cloirec, P., J.L. Fanlo et J.R. Degorce-Dumas** (1991). Traitement des odeurs et désodorisation industrielle. *Innovation* **128**: 267.
- Leclerc, M., R. Moletta et J.J. Godon** (In press). Diversity of the archaeal community in 44 digester as determined by SSCP analysis and 16S rDNA sequencing. *Environ. Microbiol.* **In Press**.

- Lee, L.G., C.R. Connell et W. Bloch** (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* **21**: 3761-3766.
- Leser, T.D., J.Z. Amenuvor, T.K. Jensen, R.H. Lindecrona, M. Boye et K. Moller** (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* **68**: 673-690.
- Levasseur, P.** (1998). Composition des lisiers de porc, facteurs de variation et méthodes d'évaluation. ANDA. Paris.
- Levasseur, P. et C. Texier** (2001). Teneurs en éléments-trace métalliques des aliments et des lisiers de porcs à l'engrais, de truies et de porcelets. *Journées de la Recherche Porcine en France* **33**: 57-62.
- Lin, C., L. Raskin et D.A. Stahl** (1997). Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals : comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol* **22**: 281-294.
- Lung, K. et E. Topp** (2001). Bacterial community in liquide swine manure during storage: molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. *FEMS Microbiol Ecol* **38**: 169-177.
- Lupton, S.** (1998). Les banques de lisiers aux Pays Bas : un système original d'échange et de transport des déjections animales. *Journées de l'Association française de sciences économiques*, Toulouse.
- Mackie, R.I., P.J. Stroot et V.H. Varel** (1998). Biochemical identification and biological origin of key odor components in livestock waste. *J Anim Sci* **76**: 1331-1342.
- Maidak, B.L., J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T. Parker Jr, P.R. Saxman, R.J. Farris, G.M. Garrity, G.J. Olsen, T.M. Schmidt et J.M. Tiedje** (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **29**: 173-174.
- Marshall, K.C.** (1993). Microbial ecology: Whither goest thou? *Trends in Microbial Ecology Physiological ecology*: 5-8.
- Martinez, J. et G. Le Bozec** (2000). Déjections porcines et problèmes environnementaux en Europe. *Cahiers Agriculture* **9**: 181-190.
- Martinez, J.** (1999). Connaissance et maîtrise des émissions gazeuses en système d'élevage développe. Comment concilier production porcine et protection de l'environnement. CEMAGREF Editions. Paris.
- Martinez, J.** (1996). Traitement des dejections animales (lisiers) en France : bref aperçu. *Ingénieries - EAT - Dejections animales en Europe*.
- Martinez, J. et C.H. Burton** (1994). Traitement du lisier de porc par aération-sédimentation. *Informations Techniques du CEMAGREF* **94**(4): 1-8.
- Massana, R., A.E. Murray, C.M. Preston et E.F. DeLong** (1997). Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* **63**: 50 - 56.
- McCrary, D.F. et P.J. Hobbs** (2001). Additives to reduce ammonia and odor emission from livestock waste: A review. *J Environ Qual* **30**: 345-355.

- McInerney, M.J.** (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. A.J.B. ZEHNDER. New York, John Wiley & Sons: 373-416.
- Merzouki, M.** (2001). Dephosphatation anoxique d'effluents par voie biologique : optimisation et mise en oeuvre d'un procédé intégré de dépollution azotée et phosphorée. *Microbiologie et l'environnement*. Narbonne, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah: 157.
- Miller, T.L.** (1991). Biogenic sources of methane. Microbial production and consumption of greenhouse gases : methane, nitrogen oxides and halomethanes. J.E. ROGERS and W.B. WHITMAN. New York, ASM Publications: 175-186.
- Moir, J.W.B., L.C. Crossman, S. Spiro et D.J. Richardson** (1996). The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Letters* **387**(1): 71-74.
- Moore, W.E.C., L.V.H. Moore, E.P. Cato, T.D. Wilkins et E.T. Kornegay** (1987). Effect on high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. *Appl Environ Microbiol* **53**: 1638-1644.
- Mosche, M. et H.J. Jordening** (1999). Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. *Wat Res* **33**(11): 25-45.
- Munson, M.A., D.B. Nedwell et T.M. Embley** (1997). Phylogenetic diversity of Archaea in sediments samples from a coastal salt marsh. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4729-4733.
- Mustin, M.** (1987). *Le compost : gestion de la matière organique*. Editions François Dubusc. Paris.
- Nalin, R., L. Ranjard, S. Nazaret et P.W. Simonet** (1998). La biologie moléculaire en écologie microbienne du sol : application à l'analyse de la structure des communautés bactériennes. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **13**: 21-26.
- NASS** (2002). www.usda.gov/nass/
- Noël, C., C. Peyronnet, D. Gerbod, V.P. Edgcomb, P. Delgado-Viscogliosi, M.L. Sogin, M. Capron, E. Viscogliosi et L. Zenner** (2003). Phylogenetic analysis of Blastocystis isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Molecular Biochemical Parasitology* **126**: 119-123.
- Ohkuma, M., S. Noda, K. Horikoshi et T. Kudo** (1995). Phylogeny of symbiotic methanogens in the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. *FEMS Microbiol Letters* **134**(1): 45-50.
- Ohta, Y. et M. Ikeda** (1978). Deodorization of pig feces by Actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* **36**: 487-491.
- Olsen, G.J., D.L. Lane, S.J. Giovannoni, N.R. Pace et D.A. Stahl** (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* **40**: 337-365.
- Oremland, R.S.** (1988). Biogeochemistry of the methanogenic bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. A.J.B. ZEHNDER. New York, John Wiley & Sons: 641-706.
- Pace, N.R.** (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734-740.

- Pace, N.R., G.J. Olsen et C.R. Woese** (1986). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* **45**(3): 325-326.
- Parkin, G.F., R.E. Speece, C.H.J. Yang et W.M. Kocher** (1983). Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **55**(1): 44-53.
- Payne, W.J.** (2001). Anaerobic respiration. *Encyclopedia of life sciences*.
- Percheron, G., N. Bernet et R. Moletta** (1996). A new method for the determination of dissolved sulfide in strongly colored anaerobically treated effluents. *Bioprocess Engineering* **15**(6): 317-322.
- Prosser, J.I.** (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Advance in Microbial Physiology* **30**: 125-177.
- Pryde, S.E., A.J. Richardson, C.S. Stewart et H.J. Flint** (1999). Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. *Appl Environ Microbiol* **65**(12): 5372-5377.
- Quilez, J., A. Clavel, S.-A. C. et A.C. Causape** (1995). Detection of *Blastocystis* sp. in pigs in Aragon (Spain). *Veterinary Parasitology* **56**: 345-348.
- Rainelli, P.** (2001). L'image de la viande de porc en France. *Courrier de l'environnement de l'INRA* (42): 47-60.
- Reid, G.** (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3763-3766.
- Rivière, J., J.C. Subtil et G. Catroux** (1974). Etude de l'évolution physico-chimique et microbiologique du lisier de porcs pendant le stockage anaérobie. *Ann Agron* **25**: 383-401.
- Robinson, I.M., M.J. Allison et J.A. Bucklin** (1981). Characterization of cecal bacteria of normal pigs. *Appl Environ Microbiol* **41**: 950-955.
- Robinson, J.A., W.J. Smolenski, M.L. Ogilvie et J.P. Peters** (1989). In vitro total gas, CH₄, H₂, volatile fatty acids and lactate kinetics studies on luminal contents from the small intestine, cecum and colon of the pig. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2460-2467.
- Roszak, D.B. et R.R. Colwell** (1987). Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl Environ Microbiol* **53**(12): 2889-2893.
- Roszak, D.B., D.J. Grimes et R.R. Colwell** (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can J Microbiol* **30**: 334-338.
- Rousselon, N., J.P. Delgenès et J.J. Godon** ((In press)). Description of a new bacterial indicator of human or animal fecal pollution and detection by a real time PCR (Taq Man PCR). *Journal of Microbiological Methods*. **In Press**.
- Russell, E.G.** (1979). Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Appl Environ Microbiol* **37**(2): 187-193.
- Russell, J.B., H.J. Strobel et G.J. Chen** (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl Environ Microbiol* **54**(4): 872-877.

- Saitou, N. et M. Nei** (1987). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular and Biological Evolution* **4**(4): 406-425.
- Salanitro, J.P., I.G. Blake et P.A. Muirhead** (1977). Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Appl Environ Microbiol* **33**(1): 79-84.
- Sanger, F., S. Nicklen et A.R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5463-5467.
- Schink, B.** (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Rev* **61**(2): 262-280.
- Schleper, C., G. Puehler, I. Holz, A. Gambacorta, D. Janekovic, U. Santarius, H.P. Klenk et W. Zillig** (1995). *Picrophilus* gen. nov., fam. Nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J Bacteriol* **177**: 7050-7059.
- Schnurer, A., B.H. Svensson et B. Schink** (1997). Enzyme activities in and energetics of acetate metabolism by the mesophilic syntrophically acetate-oxidizing anaerobe *Clostridium ultunense*. *FEMS Microbiol Letters* **154**: 331-336.
- Sercombe, D.C.W.** (1995). The control of septicity and odours in sewage systems and at sewage treatment works operated by anglian water services limited. *Wat. Sci Technol* **31**(7): 283-292.
- Shinzato, N., T. Matsumoto, I. Yamaoka, T. Oshima et Y. A.** (1999). Phylogenetic diversity of symbiotic methanogens living in the hindgut of the lower termite *Reticulitermes speratus* analyzed by PCR and in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **65**: 837-840.
- Simpson, J.M., V.J. McCracken, H.R. Gaskins et R.I. Mackie** (2000). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl Environ Microbiol* **66**(11): 4705-4714.
- Sindall, M.E., K.S. Reece, T.A. Nerad et E.M. Burreson** (2001). Molecular determination of the phylogenetic position of a species in the genus *Copodella* (Alveolata). *American Museum Novitates* **33**: 1-14.
- Sorlini, C. et P. Bonfanti** (1989). Digestion of animal slurries: Technological, chemical, microbiological, and managerial aspects. *Biological waste treatment*. A. MIZRAHI. New York, Alan R. Liss Inc. **12**: 203-234.
- Speece, L.L.** (1996). *Anaerobic biotechnology*. Archaea Press. Tennessee.
- Spoelstra, S.F.** (1978). Enumeration and isolation of anaerobic microbiota of piggery waste. *Appl Environ Microbiol* **35**(5): 841-846.
- Spoelstra, S.F.** (1979). Volatile fatty acids in anaerobically stored piggery wastes. *Neth. J. Agric. Sci.* **27**: 60-66.
- Staley, J.T. et A. Konopka** (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321-46.

- St-Arnaud, S., J.G. Bisailon et R. Beudet** (1991). Microbiological aspects of ammonia oxidation of swine waste. *Can J Microbiol* **37**: 918-923.
- Stewart, C.S.** (1997). Microorganisms in hindgut fermentors. *Gastrointestinal microbiology*. R.I. MACKIE, B.A. WHITE and R.E. ISAACSON. New York, Chapman and Hall. **2**: 142-186.
- Strauch, D.** (1987). Microbiological specifications of disinfected compost. *Compost: Production, quality and use*. M. BERTOLDI, M.P. FERRANTI, P. L'HERMITE and F. ZUCCONI. London, Elsevier: 210-229.
- Strunk, O. et W. Ludwig** (1997). <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>
- Sutton, A.L., K.B. Kephart, M.W.A. Verstegen, T.T. Canh et P.J. Hobbs** (1999). Potential reduction of odorous compounds in swine manure through diet modification. *J. Anim. Sci.* **77**: 430-439.
- Suzuki, M.T., L.T. Taylor et E.F. DeLong** (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial Populations via 5'-Nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605-4614.
- Tajima, K., R. Aminov, T. Nagamine, K. Ogata, M. Nakamura, H. Matsui et Y. Benno** (1999). Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiol Ecol* **29**: 159-169.
- Tajima, K., T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura et R.I. Aminov** (2001). Phylogenetic analysis of archaeal 16S r RNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiol Letters* **200**: 67-72.
- Tang, J.-C., T. Kanamori, Y. Inoue, T. Yasuta, S. Yoshida et A. Katayama** (2003). Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Process Biochemistry* **In Press**.
- Tannock, G.** (1990). Lactobacillus succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1310-1316.
- Texier, C.** (1999). Les litières biomaitrisées en porcherie. Comment concilier production porcine et protection de l'environnement. CEMAGREF Editions. Paris.
- Tiquia, S.M. et N.F.Y. Tam** (1998). Composting of spent pig litter in turned and forced-aerated piles. *Environmental Pollution* **99**(3): 329-337.
- Tiquia, S.M. et N.F.Y. Tam** (2002). Characterization and composting of poultry litter in forced-aeration piles. *Process Biochemistry* **37**(8): 869-880.
- Tiquia, S.M., N.F.Y. Tam et I.J. Hodgkiss** (1996). Microbial activities during composting of spent pig-manures sawdust litter at different moisture contents. *Bioresource Technology* **55**: 201-206.
- Tiquia, S.M., N.F.Y. Tam et I.J. Hodgkiss** (1997). Effects of bacterial inoculum and moisture adjustment on composting of pig manure. *Environmental Pollution* **96**(2): 161-171.
- Tiquia, S.M., N.F.Y. Tam et I.J. Hodgkiss** (1998). Changes in chemical properties during composting of spent pig litter at different moisture contents. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **67**(1): 79-89.

- Todorov, J.R., A.Y. Chistoserdov et J.Y. Aller** (2000). Molecular analysis of microbial communities in mobile deltaic muds of Southeastern Papua New Guinea. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 147-155.
- Tokura, M., M. Ohkuma et T. Kudo** (2000). Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protist in the gut and with the gut epithelium of termites. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 233-240.
- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka et M. Itavaara** (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* **72**(2): 169-183.
- Varel, V.H., J.T. Yen et K.K. Kreikemeier** (1995). Addition of cellulolytic clostridia to the bovine rumen and pig intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **61**(3): 1116-1119.
- Vavilin, V.A. et L.Y. Lokshina** (1996). Modeling of volatile fatty acids degradation kinetics and evaluation of microorganism activity. *Bioresource Technology* **57**(1): 69-80.
- Vogels, G.D., J.T. Keltjens et C. van der Drift** (1988). Biochemistry of methane production. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. A.J.B. ZEHNDER. New York, John Wiley & Sons: 707-770.
- von Wintzingerode, F., U.B. Göbel et E. Stackebrandt** (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 213-229.
- Vuorinen, A.H. et M.H. Saharinen** (1997). Evolution of microbiological and chemical parameters during manure and straw co-composting in a drum composting system. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **66**(1): 19-29.
- Ward, D.M., R. Weller et M.M. Bateson** (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**: 63-65.
- Warikoo, V., M.J. McInerney, J.A. Robinson et J.M. Suflita** (1996). Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation by syntrophic consortia. *Appl Environ Microbiol* **62**: 26-32.
- Watabe, M., J.R. Rao, T.A. Stewart, J. Xu, B.C. Millar, L. Xiao, C.J. Lowery, J.S.G. Dooley et J.E. Moore** (2003). Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated and unseparated stored pig slurry. *Letters in Applied Microbiology* **36**: 208-212.
- Wheeler, M.L., O. Kandler et C.R. Woese** (1992). On the nature of global classification. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 2930-2934.
- Whitehead, T.R. et M.A. Cotta** (1999). Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. *FEMS Microbiol Letters* **179**(2): 223-226.
- Whitehead, T.R. et M.A. Cotta** (2001). Characterization and comparison of microbial populations in swine manure faeces and manure storage pits by 16S rDNA gene sequence analysis. *Anaerobe* **7**: 181-187.
- Wiesmann, U.** (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. *Advances Biochem Eng Biotech* **51**: 113-153.

- Williams, A.G.** (1984). Indicators of piggery slurry odour offensiveness. *Agricultural wastes* **10**: 15-36.
- Williams, A.G. et M.R. Evans** (1981). Storage of piggery slurry. *Agricultural Wastes* **3**: 311-321.
- Wimpenny, J.** (1993). Spatial gradients in microbial ecosystems. *Trends in Microbial Ecology Physiological ecology*: 135-140.
- Witham, P.K., C.T. Yamashiro, K.J. Livak et C.A. Batt** (1996). A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in ground beef. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1347-1353.
- Woese, C.R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**(2): 221-271.
- Woese, C.R. et G.E. Fox** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(11): 5088-5090.
- Woese, C.R., O. kandler et M.L. Wheelis** (1990). Towards a natural system of organisms : proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 4576-4579.
- Wolin, M.J.** (1979). The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. *Adv. Microbiol. Ecol.* **3**: 49-78.
- Wu, J.J., S.H. Park, S.M. Hengemuehle, M.T. Yokoyama, H.L. Person, J.B. Gerrish et S.J. Masten** (1999). The use of ozone to reduce the concentration of malodorous metabolites in swine manure slurry. *Journal of Agricultural Engineering Research* **72**(4): 317.
- Xu, H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes et R.R. Colwell** (1982). Survival and viability of nonculturable *E. coli* and *V. cholerae* in the estuarine and marine environment. *FEMS Microbiol Ecol* **8**: 313-323.
- Yasuda, M., H. Oyaizu, A. Yamagishi et T. Oshima** (1995). Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from japanese hot springs. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3482-3485.
- Zehnder, A.J.B. et W. Stumm** (1988). Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. A.J.B. ZEHNDER. New York, John Wiley & Sons: 1-38.
- Zhang, R.H. et D.L. Day** (1996). Anaerobic decomposition of swine manure and ammonia generation in a deep pit. *Transactions of the ASAE* **39**: 1811-1815.
- Zhu, J.** (2000). A review of microbiology in swine manure odor control. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **78**: 93-106.
- Zhu, J., D.S. Bundy, X.W. Li et N. Rashid** (1997). Reduction of odor and volatile substances in pig slurries by using pit additives. *Journal of Environmental Science and Health* **32**: 605-619.
- Zhu, J. et L.N. Jacobson** (1999). Correlating microbes to major odorous compounds in swine manure. *Environmental Quality* **28**: 737-744.
- Zuckerlandl, E. et L. Pauling** (1962). Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. *Horizons in biochemistry*. B. PULLMAN. Academic Press. New York.

Zuckerland, E. et L. Pauling (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving genes and proteins*. V. BRYSON and H.J. VOGEL. New York, Academic Press: 97-166.

Zumstein, E., R. Moletta et J.J. Godon (2000). Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol* **2**(1): 69-78.

ANNEXES

Chapitre 1

Les **Cartes a1 et a2** présentent l'évolution de la teneur en nitrates entre 1992 et 2003 dans les eaux superficielles et dans les nappes d'eau, d'après le suivi effectué par le Conseil Général et par l'Agence de l'Eau Loire Bretagne. Les cartes sont présentées à la fin des annexes.

Chapitre 4

Tableau a4.1. Dilutions des standards utilisés pour le système de détection PIMA1.

Standard (S)	Dilution	Quantité d'ADN quantifiée (ng/μL)	Nombre de copies/μL	Nombre de copies/5 μL
0	1 en 1	2,41E+02	1,50E+11	7,4769120E+11
1	1 en 10	2,41E+01	1,50E+10	74769119769
2	1 en 100	2,41E+00	1,50E+09	7476911977
3	1 en 1,000	2,41E-01	1,50E+08	747691197,7
4	1 en 2,000	1,21E-01	7,48E+07	373845598,8
5	1 en 5,000	4,82E-02	2,99E+07	149538239,5
6	1 en 10,000	2,41E-02	1,50E+07	74769119,77
7	1 en 20,000	1,21E-02	7,48E+06	37384559,88
8	1 en 50,000	4,82E-03	2,99E+06	14953823,95
9	1 en 100,000	2,41E-03	1,50E+06	7476911,977
10	1 en 200,000	1,21E-03	7,48E+05	3738455,988
11	1 en 500,000	4,82E-04	2,99E+05	1495382,395
12	1 en 1,000,000	2,41E-04	1,50E+05	747691,1977
13	1 en 2,000,000	1,21E-04	7,48E+04	373845,5988
14	1 en 5,000,000	4,82E-05	2,99E+04	149538,2395
15	1 en 10,000,000	2,41E-05	1,50E+04	74769,11977
16	1 en 20,000,000	1,21E-05	7,48E+03	37384,55988
17	1 en 50,000,000	4,82E-06	2,99E+03	14953,82395

18	1 en 100,000,000	2,41E-06	1,50E+03	7476,911977
19	1 en 200,000,000	1,21E-06	7,48E+02	3738,455988
20	1 en 500,000,000	4,82E-07	2,99E+02	1495,382395
21	1 en 1,000,000,000	2,41E-07	1,50E+02	747,6911977
22	1 en 2,000,000,000	1,21E-07	7,48E+01	373,8455988
23	1 en 5,000,000,000	4,82E-08	2,99E+01	149,5382395
24	1 en 10,000,000,000	2,41E-12	1,50E+01	74,76911977
25	1 en 20,000,000,000	1,21E-12	7,48E+00	37,38455988
26	1 en 50,000,000,000	4,82E-13	2,99E+00	14,95382395
27	1 en 100,000,000,000	2,41E-13	1,50E+00	7,476911977

Chapitre 5

a.5.1. Suivi de la communauté globale de LPE par SSCP

Les premiers essais ont été effectués sur lisier à l'aide d'amorces PCR ciblant les bactéries et les *Archaea*. Les amorces *Archaea* permettent de mettre en évidence et de suivre 6 à 8 populations microbiennes simultanément. Par contre les amorces bactéries soulignent la très grande diversité des bactéries du lisier avec des profils contenant de 30 à 40 pics (**Fig. a5.1**).

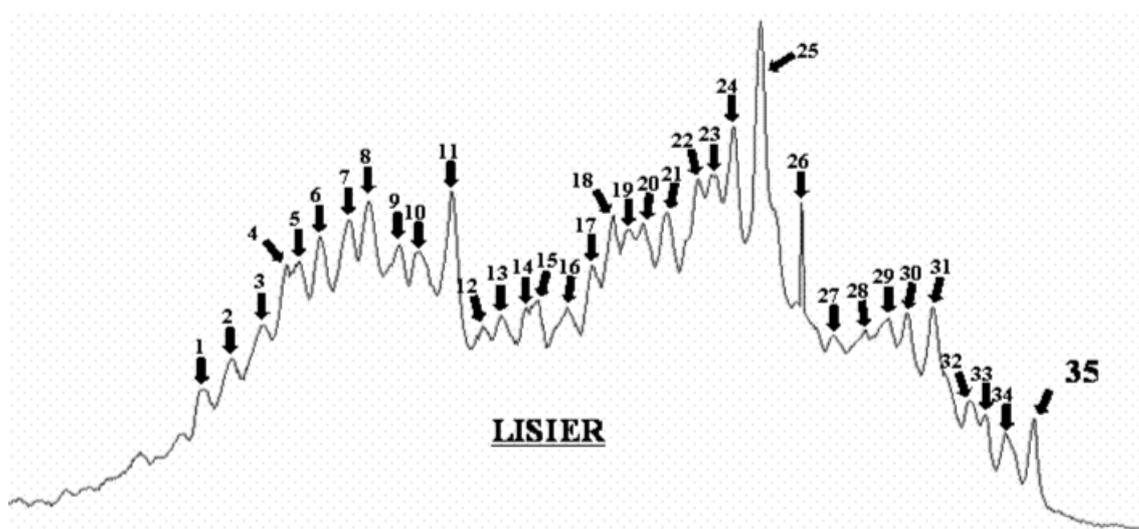


Figure a5.1. Nombre de pics du profil SSCP obtenus sur lisier de porcs d'engraissement avec les amorces *Bacteria*.

Les essais effectués sur les fèces pour comparer son profil avec celui du lisier ont montré un certain nombre de pics commun et plusieurs pics différents.

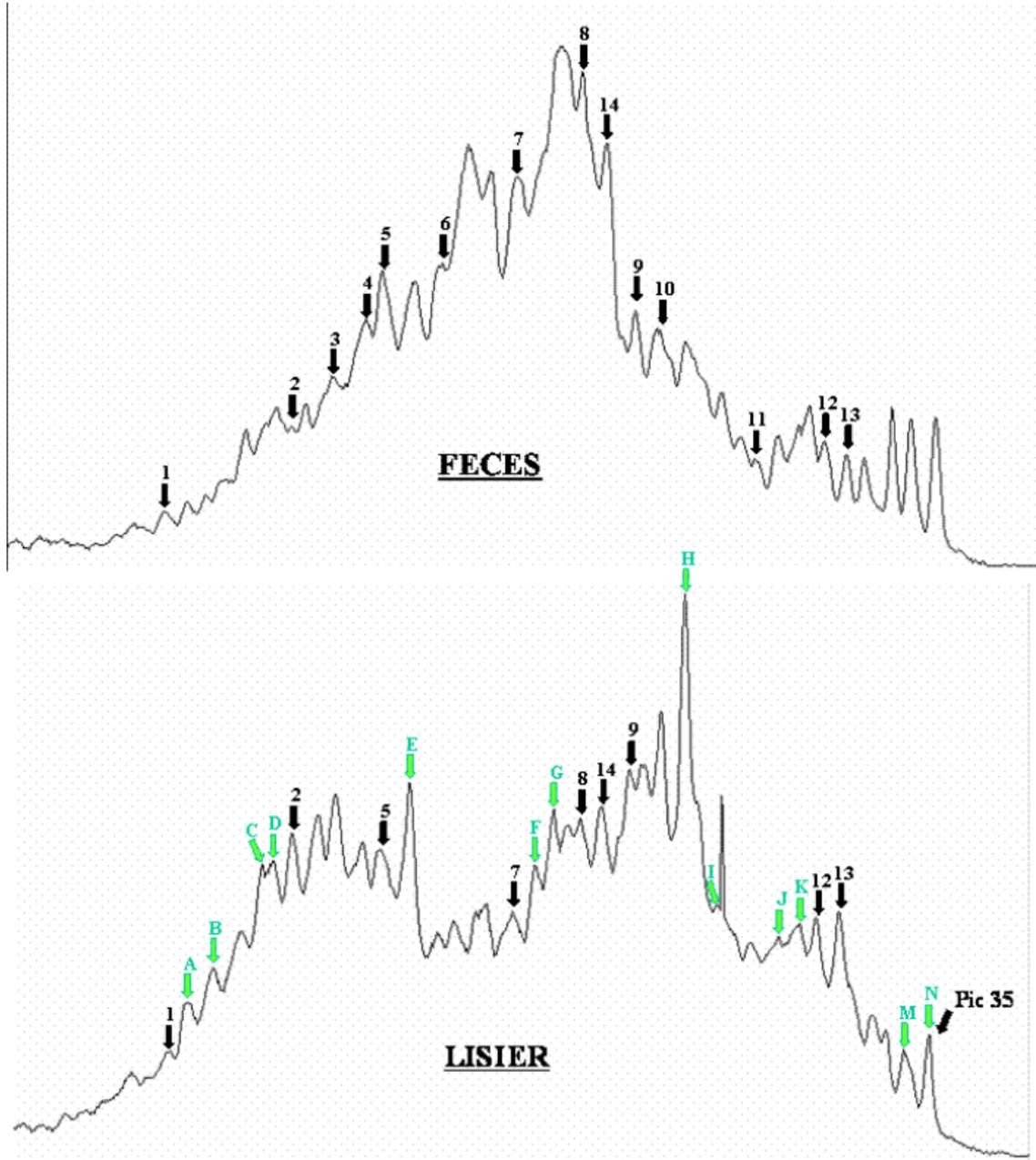


Figure a5.2. Comparaison des profils SSCP obtenus sur fèces et sur lisier de porcs d'engraissement avec les amorces *Bacteria*. Les flèches noires et vertes correspondent aux pics en commun et différents entre les deux échantillons respectivement.

Ce nombre important de pics conduisant souvent à un manque de lisibilité, nous nous orientons actuellement vers l'utilisation d'amorces PCR plus spécifiques ciblant les grands groupes bactériens du lisier.

a.5.2. Comparaison entre les banques génétiques bactériennes du LPE

Pour limiter les biais liés à la PCR (30 cycles) utilisée pour obtenir une quantité d'ADNr 16S suffisante, nous avons réuni les produits de cinq réactions indépendantes pour réaliser chaque clonage. Puis au cours de l'étude, deux kits de clonage différents ont été utilisés pour préparer les trois banques qui ont été finalement analysées (PIMALC = 32, PIMALD = 61 et PIMALE = 109).

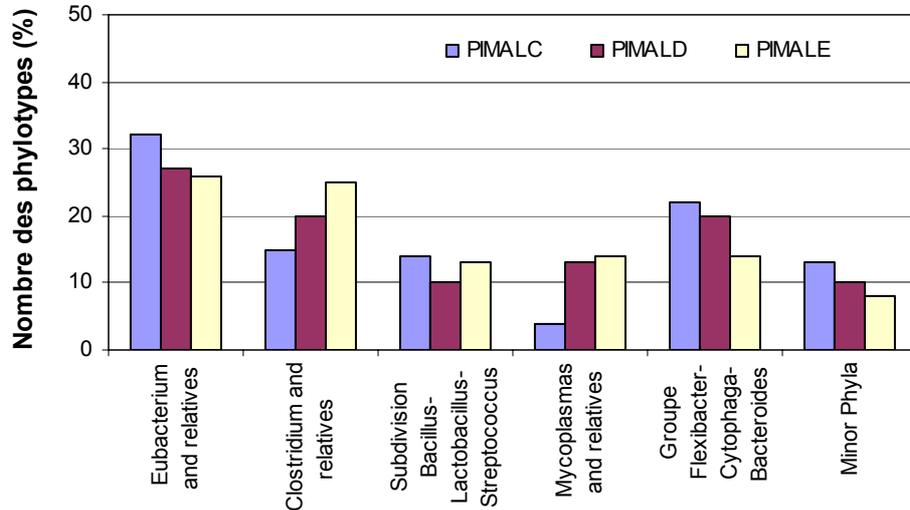
Le **Figure a5.3** compare les résultats obtenus pour chacune des banques afin d'estimer les biais qui auraient été associés à leur obtention.

L'analyse montre une diversité similaire pour les trois banques, avec la dominance des quatre principaux groupes bactériens (*Eubacterium* et apparentés, *Clostridium* et apparentés, la subdivision *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* et le groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*).

L'abondance des clones est également très similaire parmi ces groupes bactériens. Les variations observées concernent les groupes phylogénétiques les moins représentés, comme les *Mycoplasma* pour lesquels le nombre de clones analysés dans la première banque PIMALC est faible. Seules les séquences appartenant aux Spirochètes et apparentés et les chimères montre une tendance d'apparition liée au hasard.

En conclusion, cette analyse indique que l'on a réussi à réduire les biais associés à la réaction de PCR et au clonage.

(a)



(b)

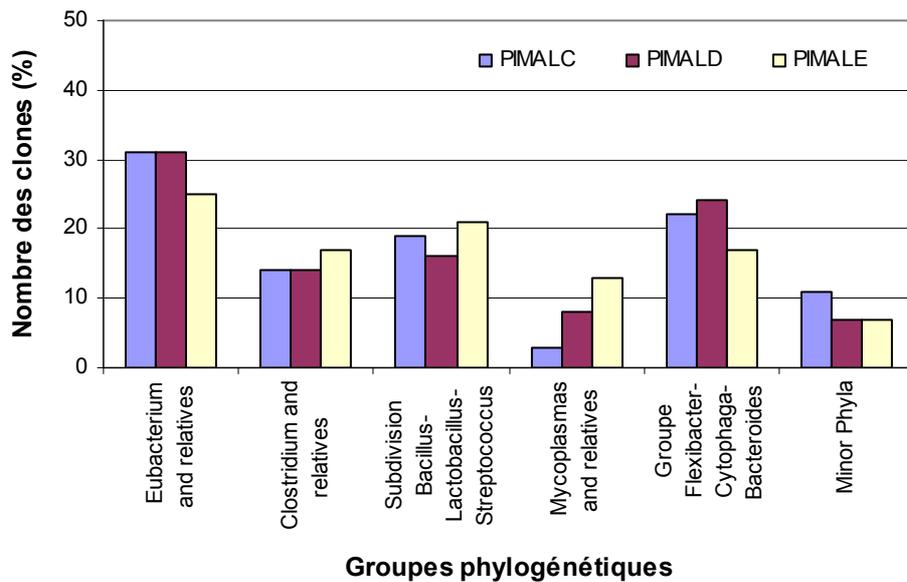


Figure a5.3. Comparaison du nombre de phylotypes (a) et de nombre de clones (b) entre les trois banques génomiques bactériennes obtenues à partir de l'ADN extrait du LPE. Les nom des groupes corresponde à Ribosomal Database Project (Maidak *et al.*, 2001).

CHAPITRE 5

Tableau a5.1. Affiliations des phylotypes de l'inventaire du lisier de porcs

Nom des phylotypes	Nombre des clones	% divergence	Affiliation des phylotypes	microorganisme et/ou séquence environnemental d'ADNr 16S plus proches avec plus de 97 % de similarité	% avec plus de 85% de similarité	Isolé de : Similarité
BACTERIA: 108 phylotypes - 202 clones						
Gram positive bas G+C : 74% phylotypes - 74% clones						
<i>Eubacterium</i> and relatives:19% phylotypes - 22% clones						
PIMALC197	10	3	<i>C. coccooides</i> group	<i>Clostridium phytofermentans</i> (AF020431)	92	Sol forestier
PIMALC18	3	0.2	<i>C. coccooides</i> group	<i>Clostridium phytofermentans</i> (AF020431)	93	Sol forestier
PIMALC24	3	0.7	<i>C. coccooides</i> group	clone p-2876-6C5 (AF371584)	93	Tract intestinal du porc
PIMALE94	3	1	<i>C. coccooides</i> group	<i>Clostridium phytofermentans</i> (AF020431)	93	Sol forestier
PIMALD07	2	0.4	<i>C. coccooides</i> group	clone p-2575-9F5 (AF371606)	95	Tract intestinal du porc
PIMALE63	2	0.7	<i>C. coccooides</i> group	clone adhufec52 (AF132274)	99	Fèces humaines
PIMALC08	1		<i>C. coccooides</i> group	clone p-189-o5 (AF371642)	99	Tract intestinal du porc
PIMALC10	1		<i>C. coccooides</i> group	<i>Roseburia cecicola</i> (L14676)	98	Intestine du porc
PIMALC75	1		<i>C. coccooides</i> group	clone BSV51 (AJ229203)	93	Sol anoxique
PIMALE03	1		<i>C. coccooides</i> group	<i>Clostridium phytofermentans</i> (AF020431)	93	Sol forestier
PIMALE103	1		<i>C. coccooides</i> group	<i>Eubacterium eligens</i> (L34420)	94	Pig intestine
PIMALE109	1		<i>C. coccooides</i> group	<i>Ruminococcus gnavus</i> (X94967)	94	Fèces humaines
PIMALE27	1		<i>C. coccooides</i> group	<i>Ruminococcus obeum</i> (X85101)	99	Fèces humaines
PIMALE36	1		<i>C. coccooides</i> group	clone p-2876-6C5 (AF371584)	87	Tract intestinal du porc
PIMALE43	1		<i>C. coccooides</i> group	clone p-2823-6C5 (AF371564)	99	Tract intestinal du porc
PIMALD46	4	0.4	<i>Eubacterium</i> group	<i>Anaerovorax odorimutans</i> (AJ251215)	89	Sédiments anoxiques
PIMALD70	4	0.4	<i>Eubacterium</i> group	clone 3C0d-16 (AB034014)	91	Rumen
PIMALC76	1		<i>Eubacterium</i> group	<i>Anaerovorax odorimutans</i> (AJ251215)	88	Sédiments anoxiques
PIMALE67	1		<i>Eubacterium</i> group	clone p-3263-42A2 (AF371681)	93	Tract intestinal du porc
PIMALE100	1		<i>C. lituseburensis</i> group	<i>Clostridium glycolicum</i> (X76750)	94	Boue
PIMALC95	1		<i>C. propionicum</i> group	<i>Clostridium lactatifermentans</i> (AY033434)	87	Caecium de poulet
21 phylotypes	44 clones			Similarité moyenne	93	
<i>Clostridium</i> and relatives: 19% phylotypes - 15% clones						
PIMALE12	2	2.2	<i>C. leptum</i> group	clone p-1877-s962-3 (AF371805)	96	Tract intestinal du porc
PIMALE17	2	1.7	<i>C. leptum</i> group	clone p-2215-s959-3 (AF371786)	96	Tract intestinal du porc
PIMALC06	1		<i>C. leptum</i> group	clone p-953-s962-5 (AF371799)	87	Tract intestinal du porc
PIMALC188	1		<i>C. leptum</i> group	clone p-882-a5 (AF371788)	97	Tract intestinal du porc
PIMALD45	1		<i>C. leptum</i> group	clone p-953-s962-5 (AF371799)	91	Tract intestinal du porc
PIMALD55	1		<i>C. leptum</i> group	clone p-900-a5 (AF371807)	97	Tract intestinal du porc
PIMALE18	1		<i>C. leptum</i> group	clone RFN25 (AB009183)	92	Rumen bovine
PIMALE28	1		<i>C. leptum</i> group	clone p-1877-s962-3 (AF371805)	99	Tract intestinal du porc

PIMALE47	1		<i>C. leptum</i> group		clone p-953-s962-5 (AF371799)	87	Tract intestinal du porc
PIMALE64	1		<i>C. leptum</i> group		clone p-2840-6C5 (AF371724)	99	Tract intestinal du porc
PIMALE91	1		<i>C. leptum</i> group		clone p-2559-9F5 (AF371715)	99	Tract intestinal du porc
PIMALE114	1		<i>C. leptum</i> group		<i>Clostridium viride</i> (X81125)	92	Colon humain
PIMALE118	1		<i>C. leptum</i> group		clone UASB brew B86 (AF332721)	89	Boues de réacteur dépurateur
PIMALD30	4	3.2	<i>C. botulinum</i> group		clone P628 (AF261822)	98	Lisier de porc
PIMALE65	3	1	<i>C. botulinum</i> group		<i>Sarcina ventriculi</i> (X76649)	98	Stomach du porc
PIMALD11	2	1.1	<i>C. botulinum</i> group		<i>Clostridium cochlearium</i> (M59093)	98	Fèces humaines
PIMALE93	2	0	<i>C. botulinum</i> group		clone p-406-o3 (AF371835)	91	Tract intestinal du porc
PIMALE106	2	2	<i>C. botulinum</i> group		<i>Clostridium thermocellum</i> (L09173)	87	Boues de réacteur dépurateur
PIMALD44	1		<i>C. botulinum</i> group		clone p-406-o3 (AF371835)	99	Tract intestinal du porc
PIMALE89	1		<i>C. botulinum</i> group		<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> (L35516)	81	Sol
PIMALE126	1		<i>C. botulinum</i> group		clone P628 (AF261822)	95	Lisier de porc
21 phylotypes	31 clones				Similarité moyenne	94	
<i>Clostridium purinolyticum</i> group: 7.5% phylotypes - 5.5% clones							
PIMALD33	3	2.2	<i>C. purinolyticum</i> group		clone WJGRT-160 (AF175656)	99	Aquifère pollué par lisier de porcs
PIMALD41	2	0.6	<i>C. purinolyticum</i> group			92	Fèces humaines
PIMALD38	1		<i>C. purinolyticum</i> group		clone PPC78 (AF445242)	98	Lisier de porc
PIMALD81	1		<i>C. purinolyticum</i> group		<i>Tissierella praeacuta</i> (X80833)	86	Sol
PIMALE08	1		<i>C. purinolyticum</i> group		<i>Helcococcus kunzii</i> (X69837)	83	Maladie d'origine hospitalier
PIMALE128	1		<i>C. purinolyticum</i> group		<i>Clostridium hastiforme</i> (X77848)	93	Sol
PIMALE44	1		<i>C. purinolyticum</i> group		<i>Helcococcus kunzii</i> (X69837)	87	Maladie d'origine hospitalier
PIMALE96	1		<i>C. purinolyticum</i> group		clone P31B-23 (AF414571)	92	Sédiment
8 phylotypes	11 clones				Similarité moyenne	91	
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>: 11% phylotypes - 20% clones							
PIMALD40	18	2.2	<i>Lactobacilli</i>		<i>Lactobacillus reuteri</i> (X76328)	99	Fèces humaines
PIMALC103	4	1.8	<i>Lactobacilli</i>		<i>Lactobacillus johnsonii</i> (AJ002515)	99	Intestine humaine
PIMALC04	1		<i>Lactobacilli</i>		<i>Lactobacillus amylovorus</i> (M58805)	99	Cattle corn silage
PIMALE07	1		<i>Lactobacilli</i>			94	Legumes et bière fermentées
PIMALE41	1		<i>Lactobacilli</i>		clone p-3424-SwA2 (AF371499)	97	Tract intestinal du porc
PIMALE84	1		<i>Lactobacilli</i>		<i>Lactobacillus reuteri</i> (X76328)	93	Fèces humaines
PIMALC07	10	1.2	<i>Streptococci</i>		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (AF201899)	99	Intestine du porc
PIMALD34	1		<i>Bacillus sphaericus</i> group		clone P610 (AF261818)	98	Lisier de porc
PIMALE33	1		<i>Carnobacterium</i> group		<i>Carnobacterium funditum</i> (S86170)	89	L'eau anoxique
PIMALE75	1		<i>Carnobacterium</i> group		clone PPC79 (AF445248)	96	Lisier de porc
PIMALC02	1		<i>Enterococcus</i> group		clone PPC44 (AF445283)	97	Lisier de porc
PIMALE39	1		<i>Staphylococcus</i> group		<i>Jeotgalibacillus psychrophilus</i> (AY028926)	97	Nourriture fermenté
12 phylotypes	41 clones				Similarité moyenne	96	
<i>Mycoplasma</i> and relatives: 15% phylotypes - 10% clones							
PIMALD48	2	0.6	<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		clone p-2731-24E5 (AF371513)	97	Tract intestinal du porc
PIMALD69	2	1.3	<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Catenibacterium mitsuokai</i> (AB030221)	97	Fèces humaines
PIMALE32	2	1.8	<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group			93	Foie de porc
PIMALE37	2	1.3	<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Acholeplasma axanthum</i> (AF412968)	93	Surface des vegetaux
					<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	92	Surface des vegetaux

PIMALC74	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Mycoplasma feliminutum</i> (U16758)	84	Pharynx de chat
PIMALE59	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Mycoplasma feliminutum</i> (U16758)	92	Pharynx de chat
PIMALE61	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Mycoplasma feliminutum</i> (U16758)	94	Pharynx de chat
PIMALE68	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Acholeplasma axanthum</i> (AF412968)	90	Foie de porc
PIMALE77	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	87	Surface des vegetaux
PIMALE79	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	81	Surface des vegetaux
PIMALE85	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Mycoplasma feliminutum</i> (U16758)	83	Pharynx de chat
PIMALD39	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group	clone p-1630-c5 (AF371516)		97	Tract intestinal du porc
PIMALD64	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group		<i>Acholeplasma laidlawii</i> (M23932)	80	Déjections animales
PIMALE40	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group	clone p-1630-c5 (AF371516)		98	Tract intestinal du porc
PIMALE35	1		<i>Acholeplasma-Anaeroplasma</i> group	<i>Eubacterium bifforme</i> (M59230)		97	Fèces humaines
PIMALE69	1		<i>Spiroplasma</i> group		clone RF39 (AF001770)	91	Rumen bovin
16 phylotypes	20 clones				Similarité moyenne	91	
Sporomusa and relatives: 2% phylotypes - 1% clones							
PIMALE16	1		<i>Sporomusa</i> group	clone p-922-s962-5 (AF371693)		98	Tract intestinal du porc
PIMALE121	1		<i>Sporomusa</i> group	<i>Acidaminococcus fermentans</i> (X77951)		98	Tractus du porc
2 phylotypes	2 clones				Similarité moyenne	98	
Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides: 17.5% phylotypes - 20% clones							
<i>Bacteroides</i> group							
PIMALC82	2	1.7	<i>Bacteroides fragilis</i> subgroup	<i>Bacteroides</i> sp. 139 (AF319778)		99	Lisier de porc
PIMALD19	1		<i>Bacteroides fragilis</i> subgroup		<i>Bacteroides uniformis</i> (L16486)	82	Fèces de porcs
PIMALE125	1		<i>Bacteroides fragilis</i> subgroup		clone FPC111 (AF445205)	93	Fèces de porcs
PIMALE98	1		<i>Bacteroides fragilis</i> subgroup	clone PPC99 (AF445253)		99	Lisier de porc
PIMALE38	4	1.1	<i>Bacteroides splanchnicus</i> subgroup		clone BCM3S-11B (AY102902)	82	Sédiments
PIMALD54	12	4.7	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		clone PPC1 (AF445251)	90	Lisier de porc
PIMALE24	3	1.6	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides merdae</i> (X83954)	85	Fèces humaines
PIMALC193	2	0.2	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup	clone PPC1 (AF445251)		99	Lisier de porc
PIMALD17	1		<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup	clone p-987-s962-5 (AF371910)		95	Tract intestinal du porc
PIMALD87	1		<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides merdae</i> (X83954)	91	Fèces humaines
PIMALC91	2	2.3	<i>Prevotella nigrescens</i> subgroup	clone p-2443-18B5 (AF371893)		95	Tract intestinal du porc
PIMALE05	2	1.5	<i>Prevotella nigrescens</i> subgroup	clone p-2517-18B5 (AF371893)		97	Tract intestinal du porc
PIMALE45	1		<i>Prevotella nigrescens</i> subgroup	clone p-993-s962-5 (AF371898)		99	Tract intestinal du porc
PIMALE15	1		<i>Prevotella nigrescens</i> subgroup		clone p-3951-23G5 (AF371897)	88	Tract intestinal du porc
<i>Cytophaga</i> group I							
PIMALD63	2	0.1	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup		<i>Empedobacter brevis</i> (M59052)	92	Intestine humain
PIMALC92	1		<i>Flavobacterium</i> subgroup		clone Bihii40 (AJ318144)	91	Déchet d'un biofiltre
PIMALD53	2	0.5	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		clone RFN47 (AB009203)	93	Rumen bovin
PIMALC17	1		<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		clone RFN41 (AB009197)	90	Rumen bovin
PIMALE95	1		N.D.		clone p-2202-s959-3 (AF371919)	92	Tract intestinal du porc
19 phylotypes	41 clones				Similarité moyenne	92	

Minor phyla : 8% phylotypes - 6% clones

Spirochetes and relatives: 2.5% phylotypes - 2.5% clones

PIMALD52	3	2.7	Spirochaeta halophila group
PIMALC96	1		Spirochaeta halophila group
PIMALD06	1		Treponema group

Proteobacteria group: 3.5% phylotypes - 2.5% clones

PIMALE29	2	0.2	<i>P. gamma</i> Xanthomonas group	<i>Pseudomonas halodenitrificans</i> (X90867)
PIMALE82	1		<i>P. gamma</i> , <i>Pseudomonas</i> group	
PIMALD71	1		<i>Proteobacteria delta</i>	
PIMALE110	1		<i>P. alpha</i> , <i>Rhodobacter</i> group	

Others: 2% phylotypes - 1% clones

PIMALC101	1		<i>Flexistipes sinusarabici</i> assemblage
PIMALC102	1		<i>Fibrobacter</i> group
9 phylotypes		12 clones	

ARCHAEA : 8 phylotypes - 44 clones

Euryarchaeota

PIMADF86	27 (11)*	3.9	CA11 group	clone Ar28 (AF157523)
PIMADF16	2 (1)	0.5	CA11 group	clone Ar21 (AF157522)
PIMADF53	2	0.5	CA11 group	clone Ar26 (AF157521)
3 phylotypes		31 clones		

PIMADF72	6	1	Methanobacteriales	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (U55233)
PIMADF10	3	2.9	Methanobacteriales	

PIMADF02	2	1	Methanomicrobiales	
PIMADF19	1		Methanomicrobiales	<i>Methanoculleus olentangyi</i> (AF095270)
PIMADF33	1		Methanomicrobiales	
3 phylotypes		4 clones		

EUCARYA : 5 phylotypes - 33 clones

PIMAE05	18 (9)	2.7	Nematoda / Rhabditida	<i>Rhabditella axei</i> (U13934)
PIMAE08	1 (1)	n.a.	Blastocystis	<i>Blastocystis</i> sp. SY94-7 (AB091249)
PIMAE012	1 (1)	n.a.	Alveolata	

PIMAE025	1		Entamoebidae	
PIMAE054	1		Alveolata	
5 phylotypes		33 clones		

clone IIIB-9 (AJ488100)	92	Boues de réacteur dépurateur
Wall less Spirochaeta sp. (M87055)	91	Kusaya gravy
<i>Treponema brennaborensis</i> (Y16568)	86	Bétail malade : dermatitis

<i>Schineria larvae</i> (AJ252146)	93	Larve de <i>Wohlfahrtia magnifica</i>
	98	Lagune polluée par le lisier de porcs
clone p-4193-6Wa5 (AF371949)	90	Tract intestinal du porc
<i>Paracoccus denitrificans</i> (X69159)	95	Sol

clone W028 (AF125202)	82	Bouche
<i>Fibrobacter intestinalis</i> (M62695)	88	Rumen
Similarité moyenne		91

	98	Lisier de porcs
	99	Lisier de porcs
	98	Lisier de porcs
Similarité moyenne		98

	99	Tract intestinal des animaux
<i>Methanosphaera stadtmanii</i> (M59139)	95	Tract intestinal des animaux

<i>Methanofollis liminatans</i> (AF095271)	94	Tract intestinal des animaux
	99	Tract intestinal des animaux
<i>Methanogenium organophilum</i> (M59131)	96	Tract intestinal des animaux
Similarité moyenne		97

	99	Sol
	97	Tract intestinal du porc
clone BOLA176 (AF372786)	86	Sédiments
<i>Entamoeba moshkovskii</i> (AF149906)	88	Sédiments des rivières et lacs pollués
clone BOLA176 (AF372786)	89	Sédiments
Similarité moyenne		92

* Le chiffre en parenthèse correspond au nombre de clones analysés par RFLP.
n.a. = non appliqué

CHAPITRE 6

Tableau a6.1. Affiliations des phylotypes de l'inventaire du fumier de porcs

Nom des phylotypes	Nombre des clones	% divergence	Affiliation des phylotypes	microorganisme et/ou séquence environnemental d'ADNr 16S plus proches	%	Isolé de :
			avec plus de 97 % de similarité	avec plus de 85% de similarité	Similarité	
BACTERIA: 153 phylotypes - 225 clones						
Gram positive bas G+C : 35 % phylotypes - 35 % clones						
Eubacterium and relatives : 6 % phylotypes - 4 % clones						
PILAJC08	1	n.a.	<i>Eubacterium</i> group	<i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i> (AF016691)	85	Boue d'estuaire
PILAJD02	1	n.a.	<i>Eubacterium</i> group	<i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i> (AF016691)	86	Boue d'estuaire
PILAJG04	1	n.a.	<i>Eubacterium</i> group	<i>Clostridium aminobutyricum</i> (X76161)	89	Marais
PILAJH01	1	n.a.	<i>Eubacterium</i> group	<i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i> (AF016691)	83	Boue d'estuaire
PILAIH04	1	n.a.	<i>C. lituseburense</i> group	<i>Clostridium bifermentans</i> (X73437)	95	Eaux résiduelles de la production de huile d'olive
PILAJG01	1	n.a.	<i>C. lituseburense</i> group	<i>Clostridium bifermentans</i> (X73437)	95	Eaux résiduelles de la production de huile d'olive
PILANB07	1	n.a.	<i>C. lituseburense</i> group	<i>Clostridium glycolicum</i> (X76750)	98	Boue
PILANH03	1	n.a.	<i>C. lituseburense</i> group	<i>Clostridium glycolicum</i> (X76750)	94	Boue
PILAIH08	1	n.a.	<i>C. coccooides</i> group	<i>Clostridium phytofermentans</i> (AF020431)	92	Sol forestier
9 phylotypes	9 clones			similarité moyenne	91	
Clostridium and relatives: 6 % phylotypes - 10 % clones						
PILAJG11	12	3,1	<i>C. botulinum</i> group	clone p-406-o3 (AF371835)	97	Tract intestinal du porc
PILAGB06	2	0,9	<i>C. botulinum</i> group	<i>Clostridium thermocellum</i> (L09173)	87	Boues de récteur dépurateur
PILAGE08	1	n.a.	<i>C. botulinum</i> group	<i>Clostridium thermocellum</i> (L09173)	94	Boues de récteur dépurateur
PILAI B11	1	n.a.	<i>C. botulinum</i> group	clone RC6 (AF001699)	88	Rumen
PILAI C12	1	n.a.	<i>C. botulinum</i> group	<i>Clostridium thermocellum</i> (L09173)	87	Boues de récteur dépurateur
PILAI G12	1	n.a.	<i>C. botulinum</i> group	PIMALD30	97	Lisier de porc
PILAJD10	1	n.a.	<i>C. botulinum</i> group	<i>Clostridium carnis</i> (M59091)	97	Viande contaminée
PILAMB02	1	n.a.	<i>C. botulinum</i> group	PIMALD44	99	Lisier de porc
PILAFH06	1	n.a.	<i>C. leptum</i> group	<i>Ruminococcus bromii</i> (X85099)	92	Rumen
PILAJB04	1	n.a.	<i>C. leptum</i> group	clone p-882-a5	96	Tract intestinal du porc
10 phylotypes	22 clones			similarité moyenne	93	
Clostridium purinolyticum group: 3 % phylotypes - 2 % clones						
PILADB05	2		<i>C. purinolyticum</i> group	<i>Peptostreptococcus ivoricus</i> (Y07840)	88	Flore endogène de l'homme et des animaux
PILAI B09	1		<i>C. purinolyticum</i> group	<i>Peptostreptococcus ivoricus</i> (Y07840)	89	Flore endogène de l'homme et des animaux
PILAJD11	1		<i>C. purinolyticum</i> group	<i>Clostridium hastiforme</i> (X77848)	92	Sol
PILAJH06	1		<i>C. purinolyticum</i> group	<i>Clostridium hastiforme</i> (X77848)	92	Sol
4 phylotypes	5 clones			similarité moyenne	90	
Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus: 10 % phylotypes - 10 % clones						
PILALG12	5	1,7	<i>Streptococci</i>	<i>Streptococcus alactolyticus</i> (AF201899)	99	Intestin de porc

PILALA07	3	3,4	<i>Carnobacterium</i> group	PIMALE75		98	Lisier de porc
PILAGC09	1	n.a.	<i>Carnobacterium</i> group		<i>Dolosigranulum pigrum</i> (X70907)	89	Sang humain infecté
PILAMA08	1	n.a.	<i>Carnobacterium</i> group		<i>Carnobacterium funditum</i> (S86170)	94	L'eau anoxique
PILAMH01	1	n.a.	<i>Carnobacterium</i> group		<i>Carnobacterium funditum</i> (S86170)	89	L'eau anoxique
PILADB11	2	0,1	<i>Enterococcus</i> group		<i>Enterococcus saccharolyticus</i> (Y18357)	87	Intestin humain
PILAEB02	2	0,3	<i>Enterococcus</i> group		<i>Enterococcus saccharolyticus</i> (Y18357)	92	Intestin humain
PILADB08	1	n.a.	<i>Staphylococcus</i> group	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (L20250)		99	Flore intestinale de l'homme
PILADA11	1	n.a.	<i>Staphylococcus</i> group	<i>Staphylococcus lentus</i> (D83370)		99	Infection du tract respiratoire des aniamaux
PILALB08	1	n.a.	<i>Lactobacilli</i>	<i>L. animalis</i> (M58807)		99	Tract intestinal des animaux
PILALG09	1	n.a.	<i>Lactobacilli</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> (X76328)		99	Fèces humaines
PILANG07	1	n.a.	<i>Lactobacilli</i>		<i>Lactobacillus reuteri</i> (X76328)	88	Fèces humaines
PILAED05	1	n.a.	<i>Bacillus sphaericus</i> subgroup		<i>Bacillus fusiformis</i> (M77486)	90	Sol
PILAMD01	1	n.a.	<i>Bacillus sphaericus</i> subgroup		<i>Bacillus fusiformis</i> (M77486)	93	Sol
PILAMH10	1	n.a.	<i>Bacillus sphaericus</i> subgroup		<i>Bacillus fusiformis</i> (M77486)	92	Sol
16 phylotypes	23 clones				similarité moyenne	94	
Mycoplasma and relatives: 10 % phylotypes - 9 % clones							
PILAI02	3	0,7	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	90	Surface des vegetaux
PILAEH04	2	0,4	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (M23728)	86	Surface de la peau
PILAFD09	2	1,7	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Anaeroplasm</i> <i>bactoclasticum</i>	89	Rumen
PILADB01	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (M23728)	90	Surface de la peau
PILAEA05	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (M23728)	87	Surface de la peau
PILAGC02	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	89	Surface des vegetaux
PILAI01	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Anaeroplasm</i> <i>bactoclasticum</i>	83	Rumen
PILAI02	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (M23728)	84	Surface de la peau
PILAJB01	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Mycoplasma feliminutum</i> (U16758)	86	Pharynx de chat
PILAJC02	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	87	Surface des vegetaux
PILAJD07	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	87	Surface des vegetaux
PILAJE09	1	n.a.	<i>Acholeplasma-Anaeroplasm</i> group		<i>Acholeplasma palmae</i> (L33734)	90	Surface des vegetaux
PILAIH02	2	0,8	<i>Spiroplasma</i> group		<i>Mycoplasma putrefaciens</i> (U26055)	80	Articulation arthritique de chèvre
PILAJA03	1	n.a.	<i>Spiroplasma</i> group		<i>Mycoplasma putrefaciens</i> (U26055)	79	Articulation arthritique de chèvre
PILAJA08	1	n.a.	<i>Spiroplasma</i> group		clone p-3870-23G5 (AF371527)	85	Tract intestinal du porc
15 phylotypes	20 clones				similarité moyenne	86	
Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides: 19 % phylotypes - 23 % clones							
<i>Bacteroides</i> group							
PILAJH12	9	1,9	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides Forsythus</i> (X73962)	87	Periodontal poches de l'homme
PILAE09	3	0,4	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides</i> sp. 2 (AB003389)	92	Rumen bovin
PILAFB12	2	0,0	<i>Rikenella microfusus</i> subgroup		clone WCHB1-29 (AF050544)	90	Aquifère contaminée par des hydrocarbures
PILAF03	2	0,4	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		PIMALC193	92	Lisier de porc
PILADF07	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides merdae</i> (X83954)	92	Fèces humaines
PILAFG04	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides merdae</i> (X83954)	89	Fèces humaines
PILAI06	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides Forsythus</i> (X73962)	86	Periodontal poches de l'homme
PILAI08	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup		<i>Bacteroides</i> sp. 2 (AB003389)	92	Rumen bovin
PILAI09	1	n.a.	<i>Bacteroides fragilis</i> subgroup		<i>Bacteroides uniformis</i> (L16486)	85	Fèces de porc

PILAJB10	1	n.a.	<i>Cytophaga fermentans</i> subgroup	<i>Cytophaga fermentans</i> (M58766)	85	Sédiment marin	
PILAJE03	1	n.a.	<i>Rikenella microfusus</i> subgroup	clone WCHB1-29 (AF050544)	90	Aquifère contaminée par des hydrocarbures	
PILAJE06	1	n.a.	<i>Cytophaga fermentans</i> subgroup	<i>Cytophaga fermentans</i> (M58766)	85	Sédiment marin	
PILAJF11	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup	PIMALE24	90	Lisier de porc	
PILAJG02	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup	PIMALC193	92	Lisier de porc	
PILAJH03	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup	PIMALC193	91	Lisier de porc	
PILAJH04	1	n.a.	<i>Porphyromonas macacae</i> subgroup	PIMALC193	93	Lisier de porc	
<i>Cytophaga</i> group I							
PILAME04	5	1,0	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	84	Intestine humain	
PILALA03	4	0,4	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	81	Intestine humain	
PILAMA01	3	1,5	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	81	Intestine humain	
PILAI05	2	0,0	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	87	Intestine humain	
PILAI08	1	n.a.	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	89	Intestine humain	
PILALB03	1	n.a.	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	82	Intestine humain	
PILALB10	1	n.a.	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	83	Intestine humain	
PILALD04	1	n.a.	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	88	Intestine humain	
PILAME03	1	n.a.	<i>Empedobacter brevis</i> subgroup	<i>Flavobacterium breve</i> (M59052)	85	Intestine humain	
PILAMF03	1	n.a.	<i>Chryseobacterium balustinum</i> subgroup	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (M58773)	84	Infection chez des grenouilles (jambres rouges)	
PILAIH09	1	n.a.	<i>Cytophaga aurantiaca</i> group	clone WCHB1-69	80	Aquifère contaminée par des hydrocarbures	
PILAJA05	1	n.a.	<i>Cytophaga aurantiaca</i> group	clone WCHB1-69	85	Aquifère contaminée par des hydrocarbures	
PILAJA07	1	n.a.	<i>Cytophaga aurantiaca</i> group	clone WCHB1-69	84	Aquifère contaminée par des hydrocarbures	
29 phylotypes	51 clones			similarité moyenne	87		

Proteobacteria group: 14 % phylotypes - 13 % clones

PILAJE08	3	4,1	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas putida</i> (AB016428)	91	Sol
PILAEF03	2	1,3	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Z76662)	92	Sol
PILAI04	2	1,5	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas putida</i> (AB016428)	94	Sol
PILAI04	2	2,4	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas putida</i> (AB016428)	95	Sol
PILAJB08	2	0,1	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Piscirickettsia salmonis</i> (U36940)	80	Eau de mer
PILAI05	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Piscirickettsia salmonis</i> (U36940)	87	Eau de mer
PILAI04	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Z76662)	85	Sol
PILAJB09	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Z76662)	88	Sol
PILAJC10	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Piscirickettsia salmonis</i> (U36940)	88	Eau de mer
PILAJF03	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Piscirickettsia salmonis</i> (U36940)	88	Eau de mer
PILALB12	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas putida</i> (AB016428)	88	Sol
PILAMF02	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Z76662)	77	Sol
PILANE04	1	n.a.	Proteobacteria, gamma subdivision	<i>Pseudomonas putida</i> (AB016428)	86	Sol
PILAJG10	2	1,7	Proteobacteria, beta subdivision	<i>Thauera aromatica</i> (X77118)	97	Boues de réacteur dépurateur (dénitrification)
PILAMH11	2	2,2	Proteobacteria, beta subdivision	<i>Denitrobacter permanens</i> (Y12639)	97	Boues de réacteur dépurateur (dénitrification)
PILANB10	2	1,1	Proteobacteria, beta subdivision	<i>Nitrosomonas europea</i> (AF037106)	95	Boues de réacteur dépurateur (nitrification)
PILAGC10	1	n.a.	Proteobacteria, beta subdivision	<i>Rhodocyclus tenuis</i> (D16208)	93	Boues de réacteur dépurateur (nitrification)
PILAGA04	1	n.a.	Proteobacteria, alpha subdivision	<i>Paracoccus denitrificans</i> (X69159)	93	Sol
PILAGH07	1	n.a.	Proteobacteria, alpha subdivision	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (X69159)	86	Sol
PILALB01	1	n.a.	Proteobacteria, alpha subdivision	<i>Sandaracinobacter sibiricus</i> (Y10678)	95	Eau hydrothermal du fond de la mer
PILAJA11	1	n.a.	Proteobacteria, delta subdivision	clone WCHB1-58	74	Aquifère contaminée par des hydrocarbures
21 phylotypes	30 clones			Similarité moyenne	89	

Minor phyla : 2 % phylotypes - 2 % clones

PILAJA01	3	1,1	Spirochetes and relatives
PILAGB01	1	n.a.	<i>Flexistipes sinusarabici</i> assemblage
PILAJG03	1	n.a.	<i>Fibrobacter</i> group
<hr/>			
3 phylotypes	5 clones		

Non affiliés : 30 % phylotypes - 27 % clones

Cluster A		
PILALF12	2	1,8
PILALG01	2	0,0
PILAGE10	1	n.a.
PILAI10	1	n.a.
PILALA01	1	n.a.
PILALA12	1	n.a.
PILALD08	1	n.a.
PILALE06	1	n.a.
PILALF11	1	n.a.
PILALG05	1	n.a.
PILALH01	1	n.a.
<hr/>		
11 phylotypes	13 clones	

Cluster B		
PILAMD09	3	1,4
PILAJG12	2	3,3
PILANA02	2	0,3
PILANC05	2	0
PILADD12	1	
PILAFH05	1	
PILAIH10	1	
PILAJD08	1	
PILALG03	1	
PILALA08	1	
PILALH12	1	
PILAMB09	1	
PILAME09	1	
PILANC12	1	
PILANE08	1	
PILANE12	1	
PILANH11	1	
PILANH12	1	
<hr/>		
18 phylotypes	23 clones	

Cluster C		
PILANA03	5	0,4
PILAMC11	2	0
PILALA09	1	
PILALA11	1	
PILALE05	1	
PILALF01	1	
PILAMA07	1	
<hr/>		
7 phylotypes	12 clones	

Wall less Spirochaeta sp. (M87055)	84	Sédiments
<i>Aminobacterium colombiense</i> (AF069287)	75	Boues de réacteur dépurateur
PIMALC102	91	Lisier de porc
<hr/>		
Similarité moyenne	83	

D'autres		
PILAJH08	2	0,4
PILANH04	2	2,3
PILAJA06	1	
PILAJA07	1	
PILALC09	1	
PILAMG03	1	
PILAND09	1	
PILANF04	1	
PILANF08	1	
PILANG01	1	
10 phylotypes	12 clones	

ARCHAEA : 14 phylotypes - 71 clones

Euryarchaeota

PILDG20	12 (11)*		CA11 group	PIMADF86		98	Lisier de porcs
PILDK30	6 (4)	0,9	CA11 group	PIMADF16		99	Lisier de porcs
PILDG23	4	2,2	CA11 group		PIMADF16	95	Lisier de porcs
PILDG38	2	1,7	CA11 group		clone P4b-Ar-25 (AF293494)	92	Tube digestif des termites
PILDJ44	1		CA11 group		clone Ar26 (AF157521)	94	Lisier de porcs
PILDK26	1		CA11 group	PIMADF53		99	Lisier de porcs
6 phylotypes	26 clones				Similarité moyenne	96	
PILDH37	3 (1)	2,8	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (U55233)		99	Tract intestinal des animaux
PILDG16	2	2,4	<i>Methanobacteriales</i>	PIMADF72		98	Lisier de porcs
PILDJ23	2	0	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i> (Z29436)		97	Tract intestinal des animaux
PILDG11	1		<i>Methanobacteriales</i>	PIMADF10		99	Lisier de porcs
PILGJ30	1		<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanosphaera stadtmanii</i> (M59139)		98	Tract intestinal des animaux
PILDK37	3	0,3	<i>Methanomicrobiales</i>		<i>Methanoculleus olentangyi</i> (AF095270)	87	Tract intestinal des animaux
PILDJ25	2	1,9	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanoculleus olentangyi</i> (AF095270)		97	Tract intestinal des animaux
PILDJ12	31 (26)	1,1	<i>Methanosarcinales</i>		<i>Methanosarcina mazei</i> (U20151)	90	Tract intestinal des animaux
8 phylotypes	45 clones				Similarité moyenne	96	

* Le chiffre en parenthèse correspond au nombre de clones analysés par RFLP.

Chapitre 7

Tableau a7.1. Dates et nomenclatures des échantillons utilisés pour le suivi des indicateurs de contamination fécal de porcs d'une filière par PCRq.

Echantillon	Date de prélèvement	Nom des échantillons
Fèces	17-avr.-03	P37
	05-mai-03	P46
	02-mai-03	P55
Lisier de la préfosse de stockage	25-nov.-02	P1 (Changé par P3 - 16/12/2002)
	17-avr.-03	P34
	02-juin-03	P48
	05-mai-02	P39 (utilisé pour le système <i>Enterococcus</i> spp.)
	16-déc.-02	P3
Lisier de la fosse de stockage	25-nov.-02	P2 (Changé par P7- 27/01/2003)
	10-mars-03	P13
	02-juin-03	P49
	05-mai-02	P40 (utilisé pour le système PIMA1)
	27-janv.-03	P7
Fraction liquide de lisier après compression	27-janv.-03	P8
	10-févr.-03	P11
	10-mars-03	P14
Lisier de la lagune	14-avr.-03	P28
	05-mai-03	P42
	02-juin-03	P51
Lisier du tonne/Utilisateur 1	14-avr.-03	P32
Lisier du tonne/Utilisateur 2	17-mars-03	P16

Tableau a7.1. Continuation.

Echantillon	Date de prélèvement	Nom des échantillons
Fraction solide de lisier après compression (compost)	13-janv.-03	P6
	10-févr.-03	P12
	10-mars-03	P15
Fraction solide de lisier après compression (compost à cœur)	24-mars-03	P21
	05-mai-03	P41
	02-juin-03	P50
Sol épandu/Utilisateur 1 avant épandage	14-avr.-03	P30
Sol épandu/Utilisateur 2 avant épandage	17-mars-03	P17
Sol épandu/Utilisateur 1 après épandage	14-avr.-03	P31
	17-avr.-03	P35
	05-mai-03	P43
	02-juin-03	P52
Sol épandu/Utilisateur 2 après épandage	17-mars-03	P18
	20-mars-03	P19
	24-mars-03	P22
	05-mai-03	P45
	02-juin-03	P54

Tableau a7.2. Résultats des matières sèches des échantillons de la filière porcine.

Echantillon et date de prélèvement	Origine des échantillons	Matière sèche (g/Kg)	Ecart type (%)
25/11/2002	25/11/2002		
P1	Préfosse de bâtiment	244,71	4,5
P2	Fosse de stockage	237,33	11,2
16/12/2002	16/12/2002		
P3	Préfosse de bâtiment	82,26	4,9
P4	Fosse de stockage	17,74	2,6
13/01/2003	13/01/2003		
P5	Fosse de stockage	24,52	0,2
P6	Fraction solide de lisier après compression	254,36	3,5
27/01/2003	27/01/2003		
P7	Fosse de stockage	21,59	0,6
P8	Fraction liquide de lisier après compression	21,05	0,4
P9	Fraction solide de lisier après compression	280,6	1,2
10/02/2003	10/02/2003		
P10	Fosse de stockage	21,8	0,5
P11	Fraction liquide de lisier après compression	21,96	0,8
P12	Fraction solide de lisier après compression	268,12	0,1
17/02/2003	17/02/2003		
P23	Sol-utilisateur 2 avant épandage	835,86	2,6
P24	Sol-utilisateur 1 avant épandage	862,46	1,8
10/03/2003	10/03/2003		
P13	Fosse de stockage	21,86	2,6
P14	Fraction liquide de lisier après compression	21,53	0,6
P15	Fraction solide de lisier après compression	276,59	3
17/03/2003	17/03/2003		
P16	Lisier de tonne Armand pour l'épandage	7,81	0,1
P17	Sol-utilisateur 2 avant épandage	878,1	0,8
P18	Sol-utilisateur 2 après épandage	868,5	15
20/03/2003	20/03/2003		
P19	Sol-utilisateur 2, 3 jours après épandage	924,29	0,8

Tableau a7.2. Continuation

Echantillon et date de prélèvement	Origine des échantillons	Matière sèche (g/Kg)	Ecart type (%)
24/03/2003	24/03/2003		
P20	Fosse de stockage	22,63	0,6
P21	Fractionne solide composté	235,9	0,9
P22	Sol-utilisateur 2, 7 jours après épandage	948,64	2,9
01/04/2003	01/04/2003		
P25	Sol-utilisateur 2 après épandage	140,25	6,3
P26	Sol-utilisateur 1 après épandage	912,19	4,2
14/04/2003	14/04/2003		
P27	Fractionne solide composté	335,19	3,8
P28	Lagune à coeur	23,16	0,1
P29	Sol-utilisateur 2 après épandage	885,02	3,5
P30	Sol-utilisateur 1 avant épandage	903,01	37,2
P31	Sol-utilisateur 1 après épandage	849,93	5,1
P32	Tonne éleveur	24,76	0,3
P33	Sol témoin utilisateur 1	838,36	1,7
17/04/2003	17/04/2003		
P34	Bâtiment	96,13	4,5
P35	Sol-utilisateur 1 après épandage	865,56	2,5
P36	Sol témoin utilisateur 1	869,29	3,7
P37	Fèces 1	259,95	6,4
P38	Fèces 2	254,32	2,2
05/05/2003	05/05/2003		
P39	Bâtiment	95,34	2,3
P40	Fosse	28,03	1,4
P41	Fractionne solide composté	223,91	19
P42	Lagune à coeur	107,2	4,5
P43	Sol-utilisateur 1 après épandage	912,85	3,6
P44	Sol témoin utilisateur 1	932,95	3,9
P45	Sol-utilisateur 2 après épandage	925,61	6,6
P46	Fèces de porc	256,12	5
P47	Fèces de truies	270,74	2,7
02/06/2003	02/06/2003		
P48	Bâtiment	14,61	1,5
P49	Fosse	31,8	3
P50	Fractionne solide composté	270,72	19,7
P51	Lagune à coeur	48,01	0,8
P52	Sol-utilisateur 1 après épandage	903,77	0,4
P53	Sol témoin éleveur	904,66	8,4
P54	Sol-utilisateur 2 après épandage	940,37	1,1
P55	Fèces	290,68	7,1

Tableau a7.3. Calculs des nombre total de copies/ μL pour les standards (A) et de nombre total de copies/g MS pour les échantillons (B).

A

ETALON (Standard)	Quantité d'ADN mesuré (ng/ μL)	Taille du standard (Pair de base)	Conversion de la taille du standard à: (Nombre total de copies/ μg)	Conversion du standard en g/mol à: molécules avec le numéro d'Avogadro (Nombre total de copies/ μL)
INITIAL	241	1,47E+03	9,70E+05	1,50E+11

B

Echantillon liquides	Date de prélèvement	Quantités des dilutions quantifiées (Les quantités on pris en compte la dilution) (Nombre de copies/5 μL)		
Préfosse du bâtiment				
P34	17-avr-03	4,9E+04	4,5E+04	5,0E+04
	17-avr-03	4,0E+04	4,0E+04	4,3E+04

B (continuation)

Quantité de 16S (moyenne) (Nombre de copies/5 μL)	Ecart type	Ecart type (%)	Quantité de 16S (moyenne) (Nombre de copies/ μL)
4,82E+04	2,49E+03	5	9,6E+03
4,09E+04	1,81E+03	4	8,2E+03

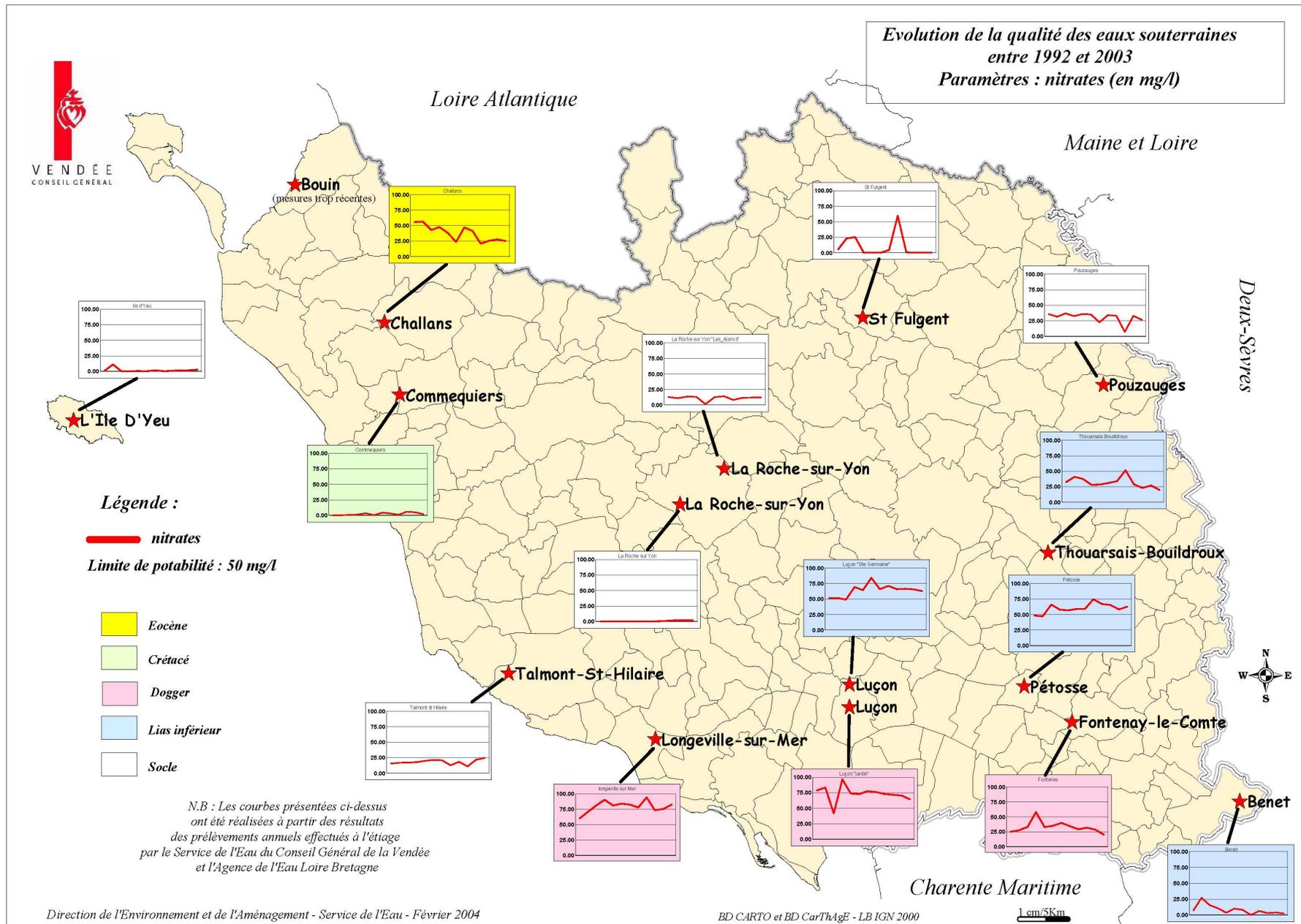
B (continuation)

Facteur de la dilution de l'extraction	Facteur de la dilution du stockage	Quantité FINALE (nombre de copies/20 mL)	Quantité FINALE (nombre de copies/mL)
10,0	4,0	3,85E+05	1,93E+04
10,0	4,0	3,27E+05	1,64E+04

B (continuation)

Matières sèches (g/mL)	Quantité FINALE (nombre de copies/g MS)
0,088	2,2E+05
0,088	1,9E+05

CARTE a1



CARTE a2



Evolution de la qualité des eaux superficielles entre 1993 et 2003
Indice de qualité nitrate (0-100)

