



➤ **Devenir des pathogènes et des gènes de résistance aux antibiotiques
dans la filière de méthanisation
depuis l'intrant jusqu'au retour au sol du digestat**

Pascal Piveteau et Anne Marie Pourcher

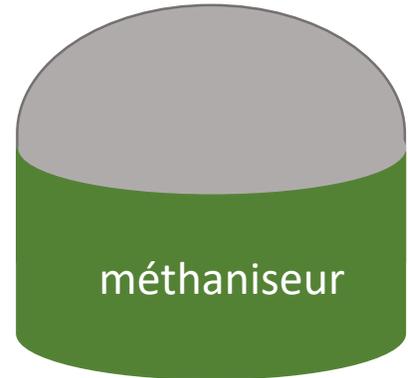


Présence de pathogènes zoonotiques et animaux et de gènes de résistance aux antibiotiques (GRAs)

D'où viennent ils?



En lien avec les intrants



effluents

lisier bovin- porcin

fumier bovin- volailles

boues de STEP

co-substrats

déchets d'abattoir

bac de dégraissage de restaurants
graisse de flottation

intercultures,
déchets verts des collectivités (tontes, feuilles...)

déchets de légumes, fruits d'IAA, de commerces

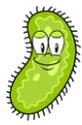
digestat



épandage
retour au sol

Intrants présentant des risques majeurs





Impact de la méthanisation sur les micro-organismes

Bactéries indicatrices d'efficacité de traitement (BIET)

Entérobactéries, entérocoques, *C. perfringens*

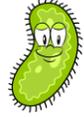
Micro-organismes pathogènes zoonotiques

Salmonella

Effet variable de la méthanisation sur les micro-organismes

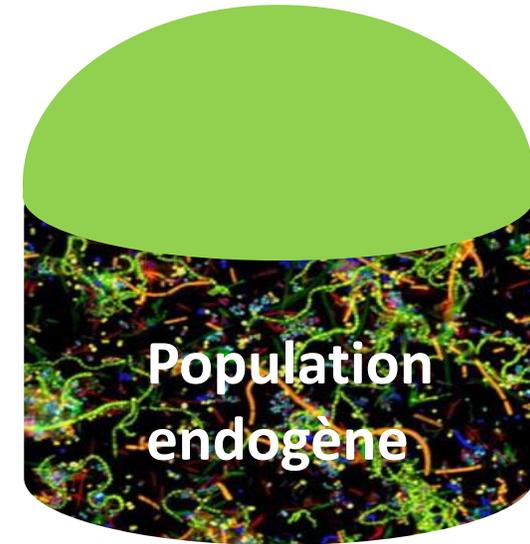
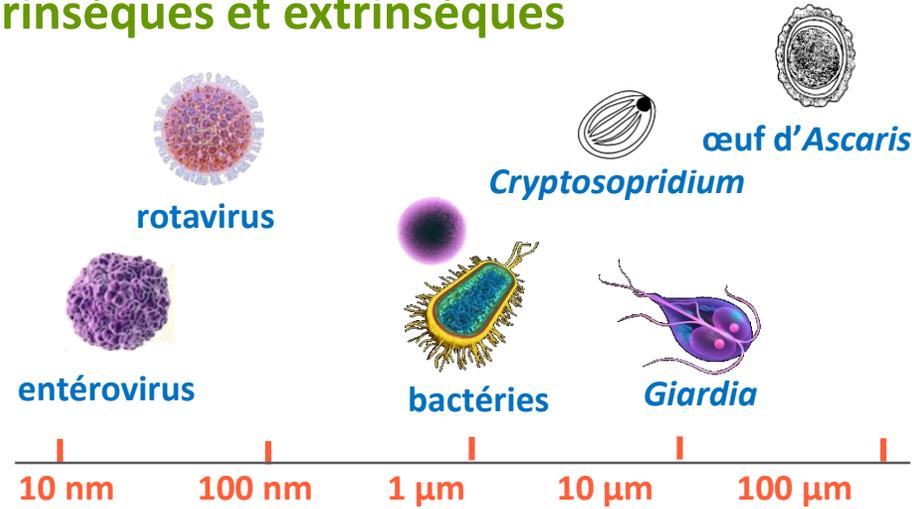
Comment expliquer ces différences ?



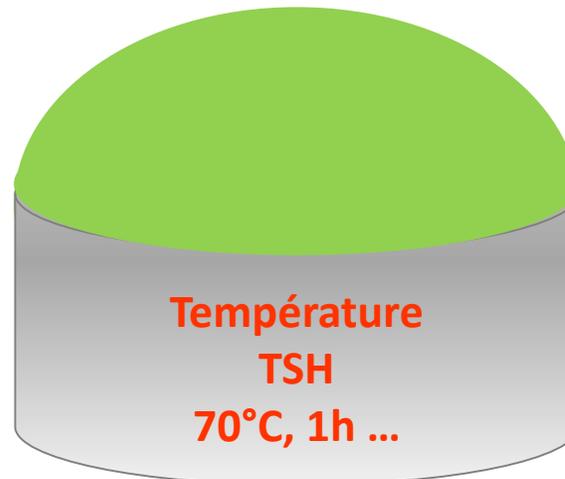


Facteurs susceptibles d'influencer l'inactivation des micro-organismes

Facteurs microbiologiques intrinsèques et extrinsèques



Paramètres opérationnels de la méthanisation





Facteurs susceptibles d'influencer l'inactivation des micro-organismes

Facteurs intrinsèques

- métabolisme, type de paroi, capacité à produire des formes de résistance (kystes, spores)

Quel que soit l'environnement, en général, survie :

Kystes de parasites et spores de bactéries > bactéries Gram + > bactéries Gram -

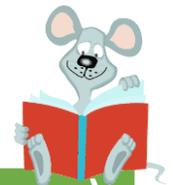


Formes végétatives

Virus : très variable selon le type de virus



Méthanisation mésophile voie liquide

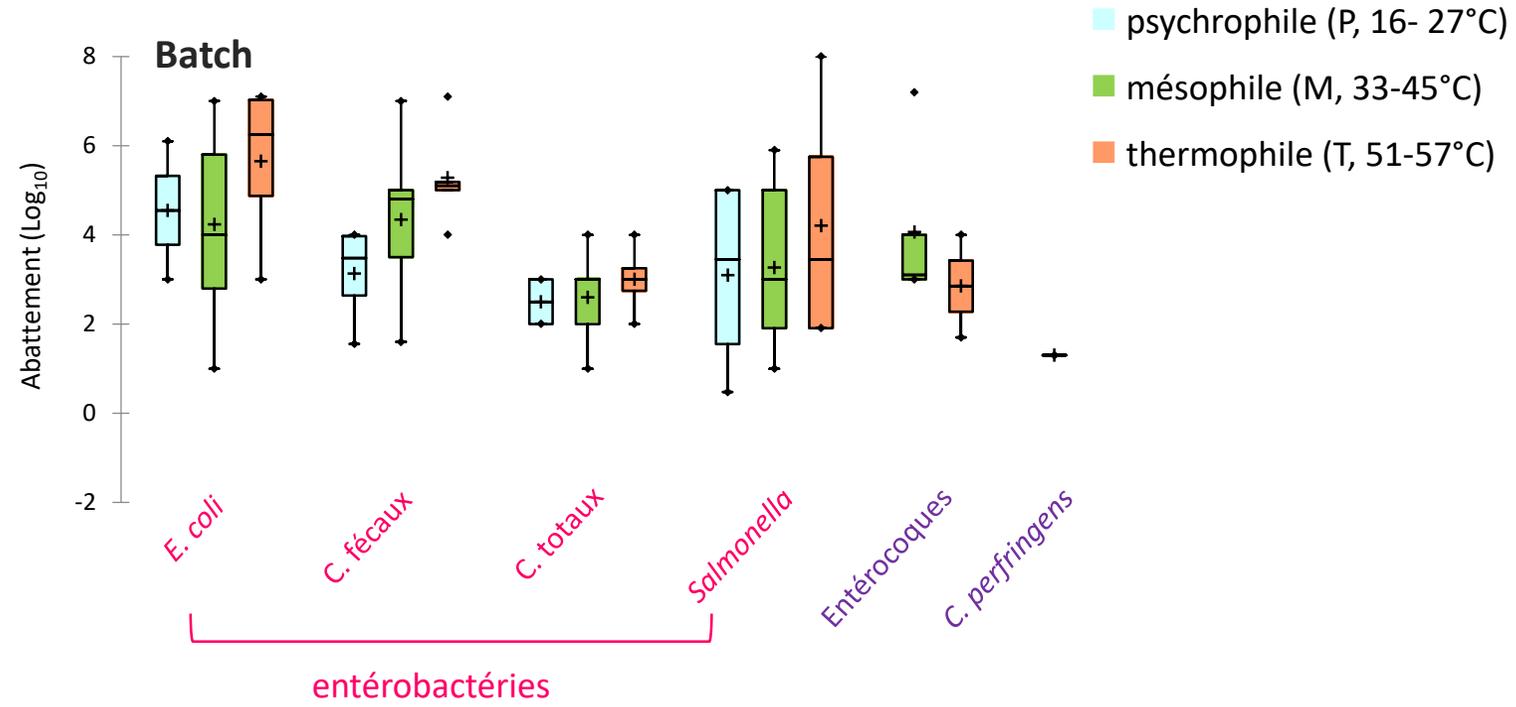


micro-organisme	caractéristiques	abattements (en Log ₁₀)
<i>Giardia</i>	parasite enkysté	0
<i>C. perfringens</i>	sporulante	0,5
Entérocoques	Gram +	1
<i>E. coli</i>	Gram -	2



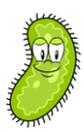
Paramètres opérationnels de la méthanisation

Température



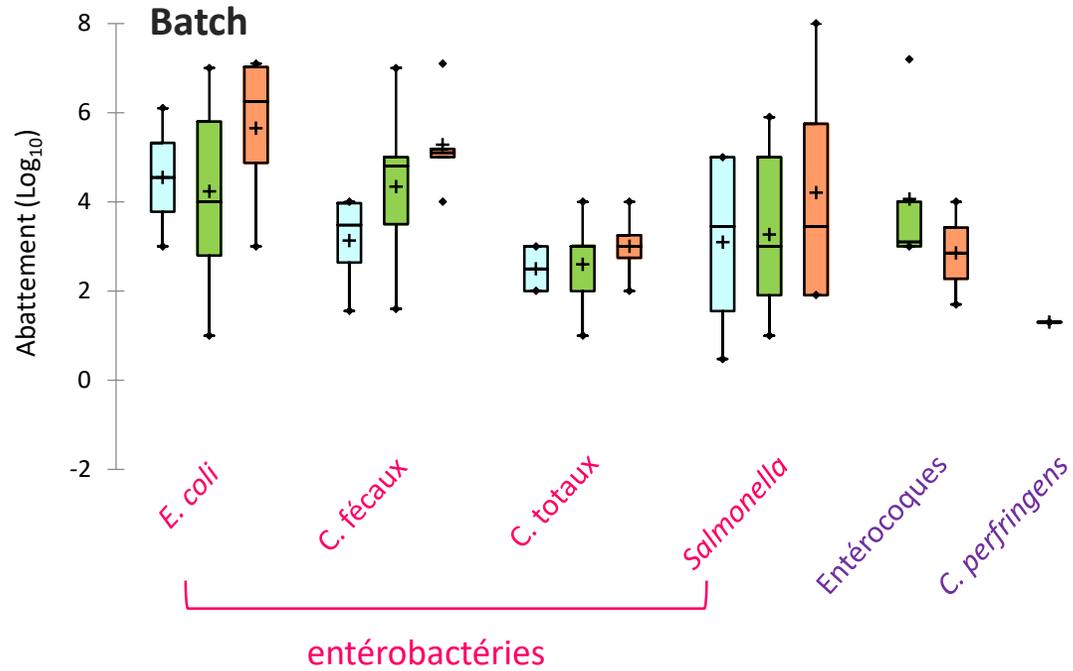
Abattements variables

Impact des températures thermophiles peu marqué



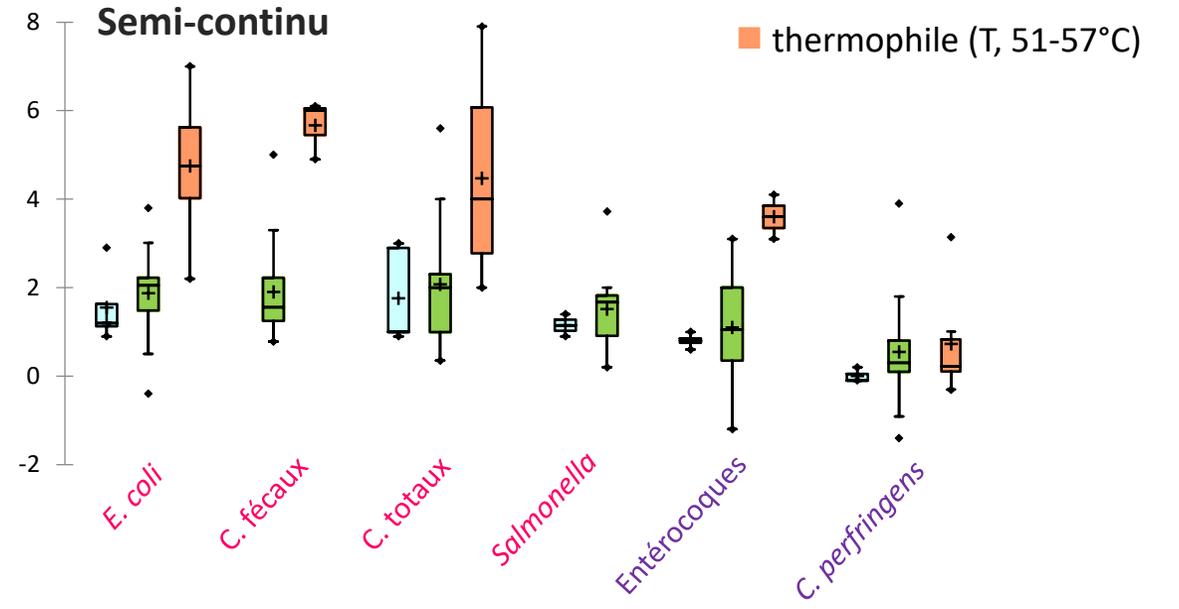
Paramètres opérationnels de la méthanisation

Température



Abattements variables

Impact des températures thermophiles peu marqué

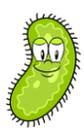


Abattements variables

Impact marqué des températures thermophiles pour les formes végétatives



INRAE

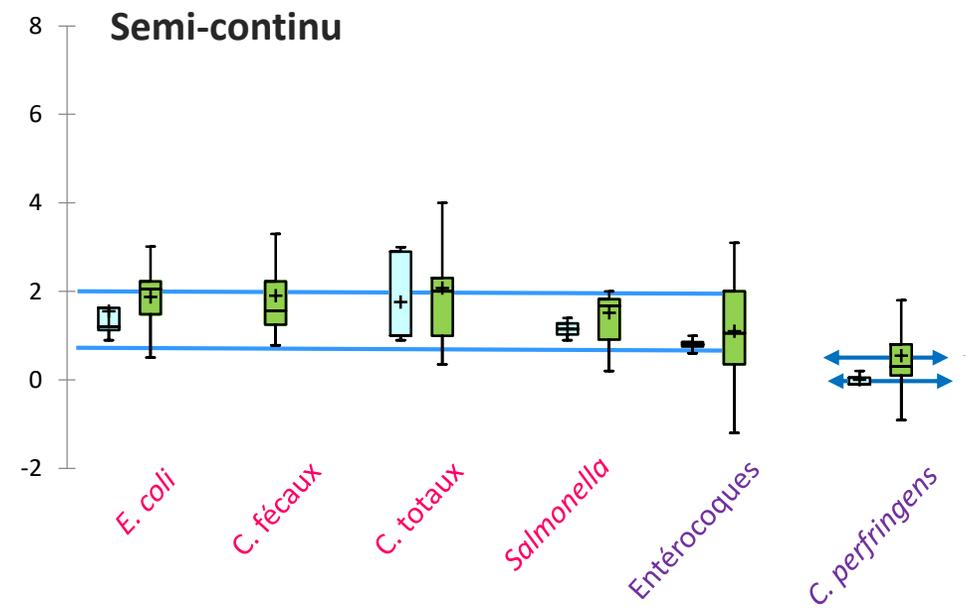
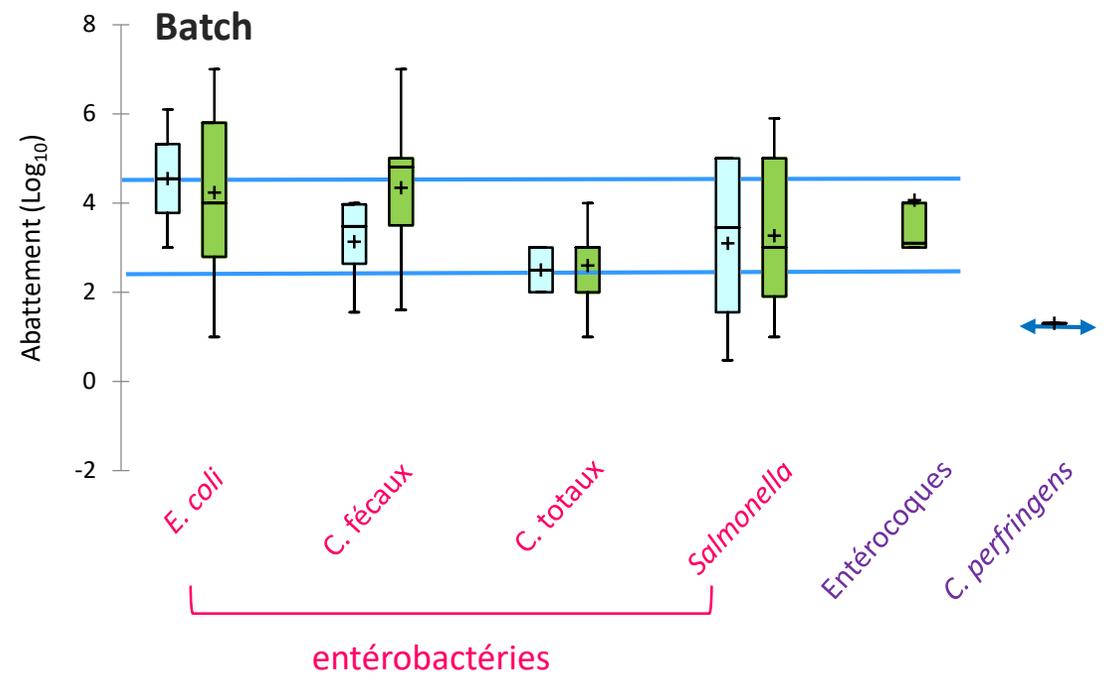


Paramètres opérationnels de la méthanisation

Température

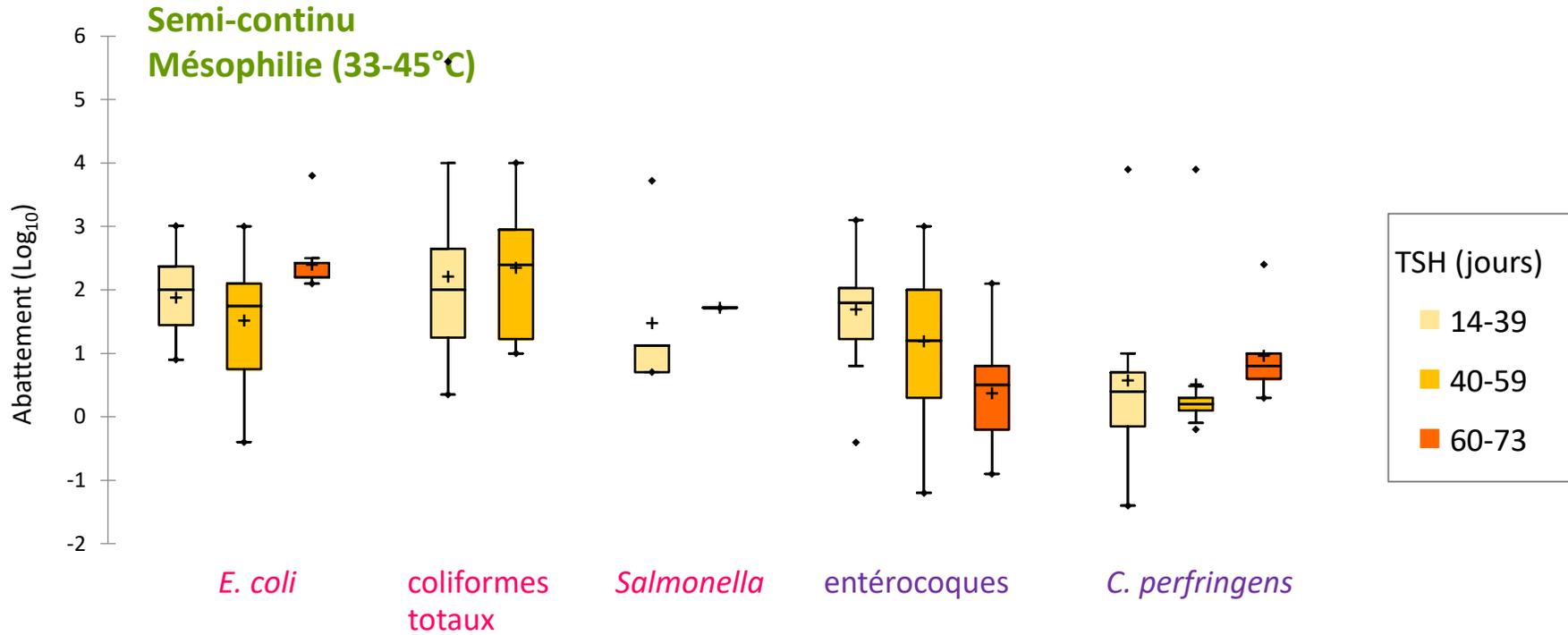


- psychrophile (P, 16- 27°C)
- mésophile (M, 33-45°C)



Digestion anaérobie psychrophile et mésophile :

Abatement moyen plus élevé en batch qu'en semi-continu



Peu d'impact du TSH sur les entérobactéries et sur *C. perfringens*

↗ TSH ↗ abt entérobactéries

mais ↘ abt entérocoques





Effet des post-traitements sur les BIET et les bactéries pathogènes

matrice	<i>E. coli</i>	Entérocoques	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. difficile</i>
Post-digestion	+	+	+/-	+/-	-	-	-
Stockage Phase liquide	-	-	+	+	-	-	-
Stockage Phase solide	-	-	+	+/-	+/-	-	-

+ effet significatif

+/- peu d'effet

- pas d'effet

Amélioration de la qualité sanitaire des sous-produits par rapport au digestat brut pour les formes végétatives

Impact moins marqué pour les clostridies



Effet des post-traitements sur les BIET et les bactéries pathogènes

matrice	<i>E. coli</i>	Entérocoques	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. difficile</i>
Post-digestion	+	+	+/-	+/-	-	-	-
Stockage Phase liquide	-	-	+	+	-	-	-
Stockage Phase solide	-	-	+	+/-	+/-	-	-
Compostage Phase solide	+	+	+	+	+	+	+

Amélioration de la qualité sanitaire des sous-produits par rapport au digestat brut pour les formes végétatives

Impact moins marqué pour les clostridies

Post-traitement le plus hygiénisant : compostage de la phase solide





Effet du prétraitement thermique (70°C, 1h)

matrice	<i>E. coli</i>	Entérocoques	<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>
Lisier traité	+ absence	+ absence	+/- légère ↘	- légère ↗

Effet uniquement sur les formes végétatives

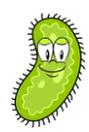


Effet du prétraitement thermique (70°C, 1h)

matrice	<i>E. coli</i>		<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>
Lisier traité	+ absence		+/- légère ↘	- légère ↗
Digestat	+ absence		+/- légère ↘	- légère ↗

Effet significatif uniquement sur *E. coli*

Très peu d'effet sur les clostridies



Effet du prétraitement thermique (70°C, 1h)

matrice	<i>E. coli</i>	Entérocoques	<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>
Lisier traité	+ absence	+ absence	+/- légère ↘	- légère ↗
Digestat	+ absence	- présence	+/- légère ↘	- légère ↗

Effet significatif uniquement sur *E. coli*

Très peu d'effet sur les clostridies

Maintien et multiplication des entérocoques initialement présents dans le digestat lors de la mise en route des digesteurs ?





Luo et al. 2017

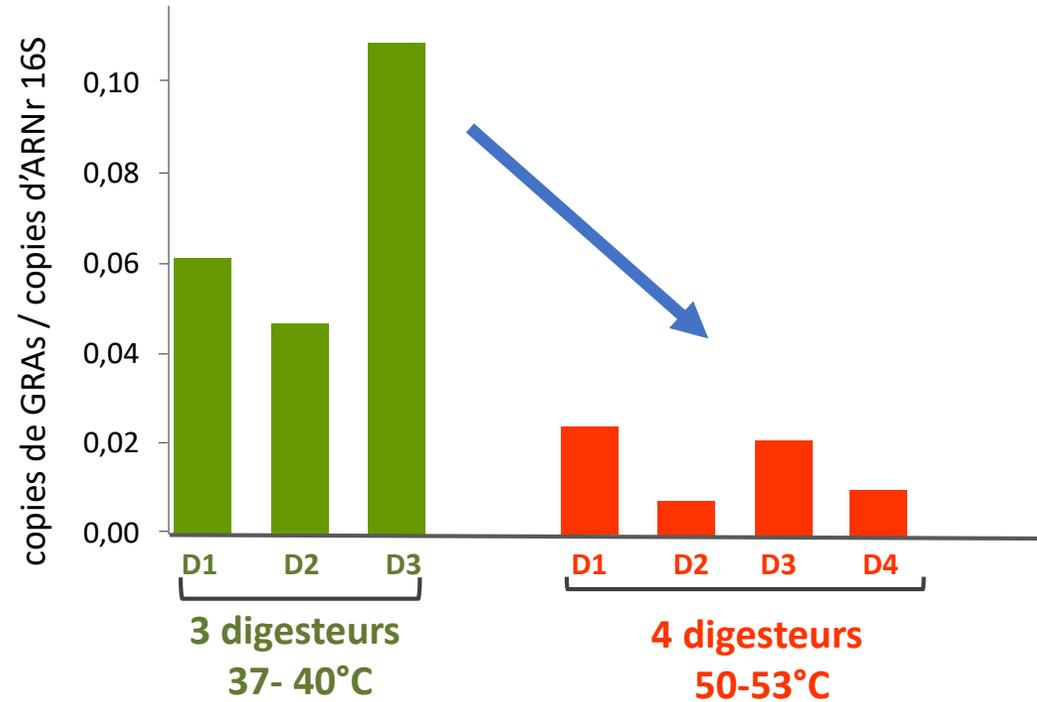


Antibiorésistance

Méthanisation mésophile / thermophile

7 méthaniseurs alimentés avec du lisier

Abondance relative des GRAs dans chaque type de digestats



Différence des teneurs relatives en GRAs entre méthaniseurs mésophiles et thermophiles



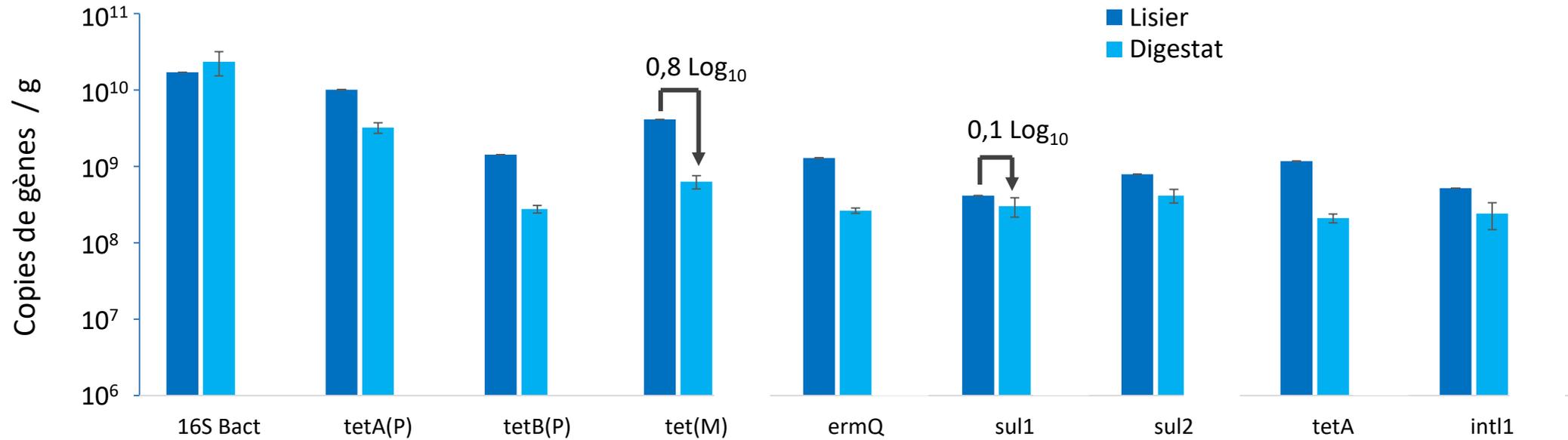
La température thermophile pourrait contrôler l'abondance relative des GRAs





Pilotes mésophiles en semi-continu

TSH: 35j, Charge 3 g DCO/L/j



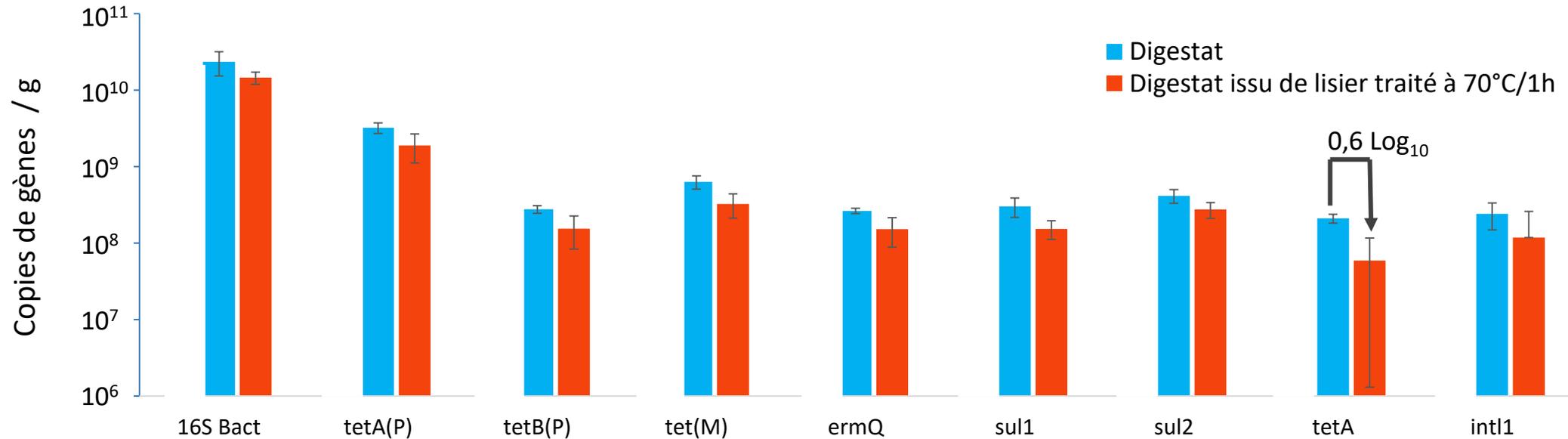
Réduction de l'abondance absolue des GRAs peu marquée :

0,1 à 0,8 Log₁₀



Pilotes mésophiles en semi-continu

TSH: 35j, Charge 3 g DCO/L/j, **70°C, 1h**

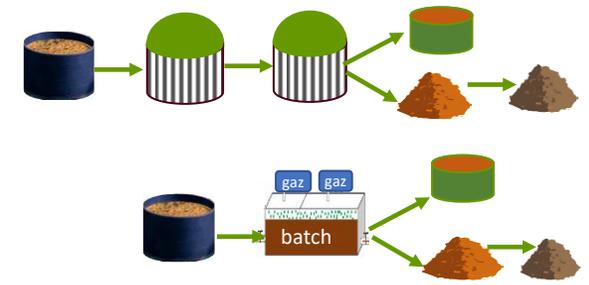


Impact du prétraitement thermique peu marqué :

0,2 à 0,6 Log₁₀



Bilan procédé et questionnements



➤ Aucun paramètre opérationnel y compris le prétraitement thermique, aucune étape de la filière ne permet d'éliminer l'ensemble des pathogènes et des GRAs présents dans les intrants

⇒ **Besoin de connaissances sur l'écologie des pathogènes au cours de la méthanisation et des post-traitements**

compétition pour la source de nutriments

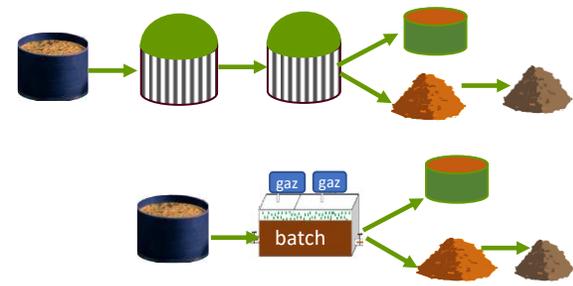
- antagonismes

- accessibilité au substrat





Bilan procédé et questionnements



➤ Aucun paramètre opérationnel y compris le prétraitement thermique, aucune étape de la filière ne permet d'éliminer l'ensemble des pathogènes et des GRAs présents dans les intrants

⇒ **Besoin de connaissances sur l'écologie des pathogènes au cours de la méthanisation et des post-traitements**

⇒ **Effet sur i) les phytopathogènes et ii) les virus/ parasites/ bactéries spécifiques des animaux ?**

➤ Les concentrations des BIETS, des pathogènes et des GRAs dépendent des concentrations initiales dans les intrants

⇒ **Nécessité de connaître la variabilité de la qualité sanitaire des intrants**

Sites recevant des effluents de plusieurs élevages :

Que faire lorsqu'il y a une contamination sur un effluent (ex: botulisme)?

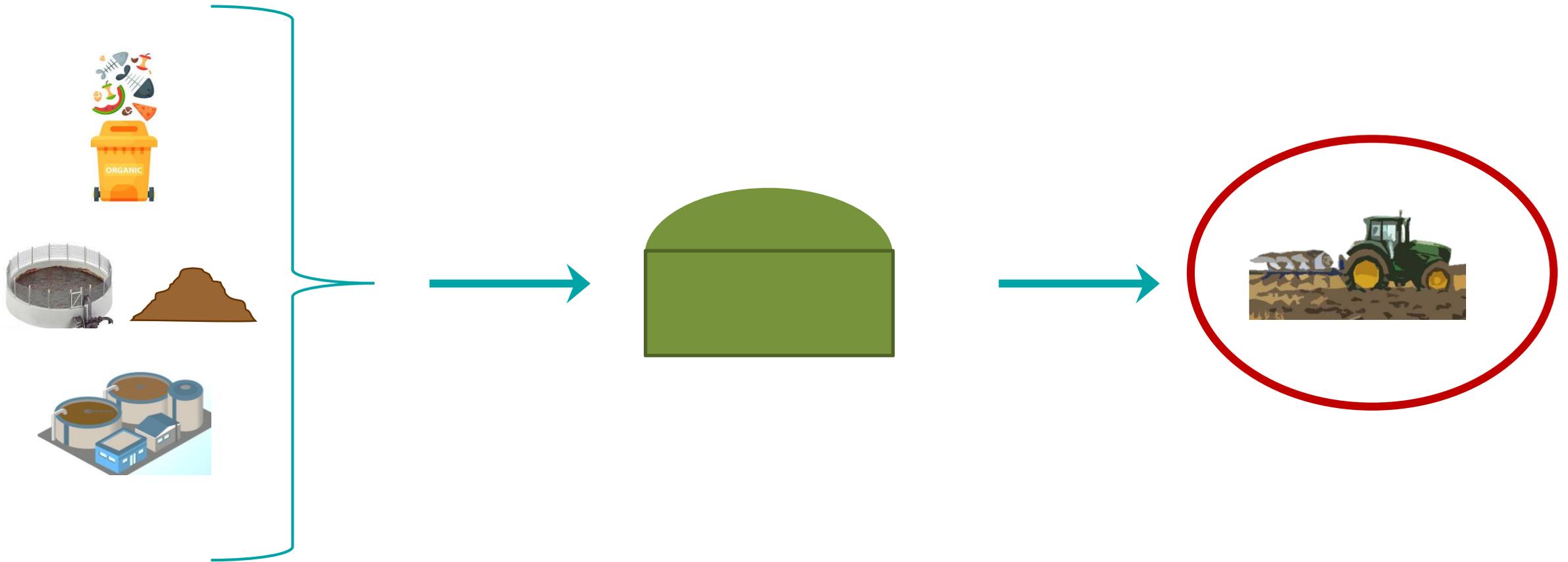


➤ Pour l'antibiorésistance

Le questionnement se situe plus au niveau du retour au sol

Quelles perturbations sur l'antibiorésistance des bactéries du sol ?

➤ Devenir de ces contaminants après épandage de digestat?



➤ Quelles données disponibles dans la littérature?

Expérimentations en conditions de laboratoire



Données du terrain



Sites expérimentaux



Études longitudinales

Majorité des données :
coliformes, *E. coli* et ses pathotypes
Clostridium sp.
Salmonella enterica
Listeria monocytogenes
Enterococcus sp.
Campylobacter jejuni

Peu de données sur :

- ✓ Virus
- ✓ Parasites

Peu ou pas de données sur :

- ✓ Microorganismes phytopathogènes
- ✓ Pathogènes d'intérêt vétérinaire (hors agents zoonotiques)

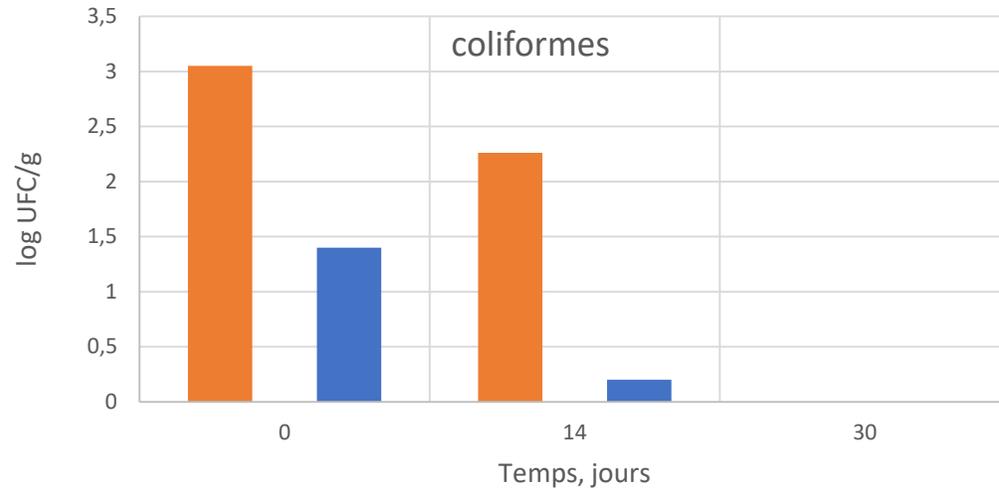
➤ Données microcosmes

Microcosmes – digestats non inoculés – T 20-22°C			
	Population initiale après épandage (UFC/g de sol)	Durée de détection	Référence
Coliformes thermotolérants	1133	< 60 jours	Gomez-Brandon <i>et al.</i> , 2016
<i>E. coli</i>	non détecté	nd	Goberna <i>et al.</i> , 2011
<i>S. enterica</i>	non détecté	nd	Goberna <i>et al.</i> , 2011
<i>Listeria sp.</i>	1000	< 90 jours	Goberna <i>et al.</i> , 2011
<i>C. perfringens</i>	2350	> 60 jours (fin de l'expérience)	Gomez-Brandon <i>et al.</i> , 2016

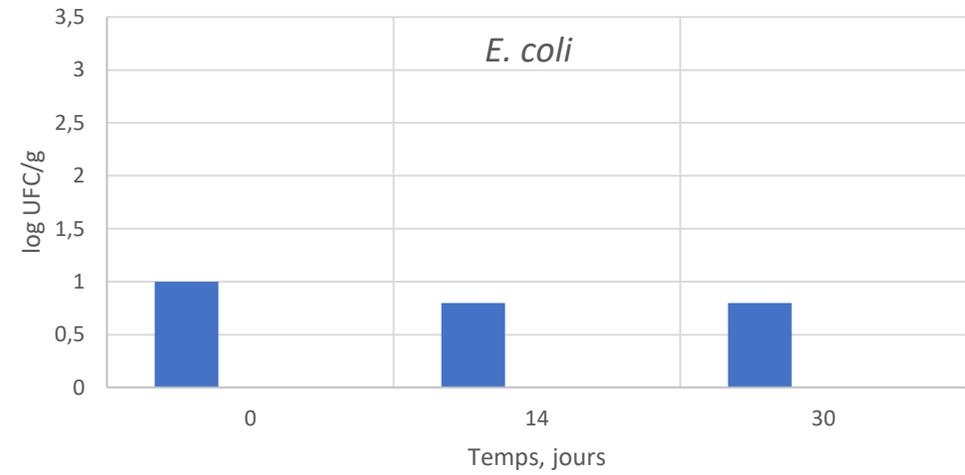
➤ Données microcosmes

Microcosmes – digestats contaminés artificiellement – T 14°C à 23°C			
microorganisme	Population initiale après épandage (UFC/g de sol)	Durée de détection	Référence
<i>E. coli</i>	10 ⁵	> 49 jours (fin de l'expérience)	Johansson <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i> O157:H7	10 ⁸	> 120 jours (fin de l'expérience)	Fongaro <i>et al.</i> , 2017
<i>E. coli</i> O157	10 ⁶	80 jours	Russell <i>et al.</i> , 2022
<i>S. enterica</i>	10 ⁸	> 49 jours (fin de l'expérience)	Johansson <i>et al.</i> , 2005
<i>S. enterica</i>	10 ⁷	> 120 jours (fin de l'expérience)	Fongaro <i>et al.</i> , 2017
<i>S. enterica</i>	10 ⁶	70 jours	Russell <i>et al.</i> , 2022
<i>C. jejuni</i>	2 10 ⁷	< 7 jours	Johansson <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i>	5 10 ⁷	< 49 jours	Johansson <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁶	40 jours	Russell <i>et al.</i> , 2022
<i>E. faecalis</i>	10 ⁶	95 jours	Russell <i>et al.</i> , 2022
<i>C. tyrobutyricum</i>	10 ³	> 49 jours (fin de l'expérience)	Johansson <i>et al.</i> , 2005
<i>C. sporogenes</i>	10 ⁶	> 120 jours	Russell <i>et al.</i> , 2022
<i>T. emersonii</i>	10 ⁵	> 49 jours (fin de l'expérience)	Johansson <i>et al.</i> , 2005
<i>B. Nivea</i>	100	< 49 jours	Johansson <i>et al.</i> , 2005
Mengovirus	10 ⁵	> 120 jours (fin de l'expérience)	Fongaro <i>et al.</i> , 2017
Phage Phi-X-174	10 ⁵	> 120 jours (fin de l'expérience)	Fongaro <i>et al.</i> , 2017
Porcine parvovirus	10 ⁶	> 49 jours (fin de l'expérience)	Johansson <i>et al.</i> , 2005

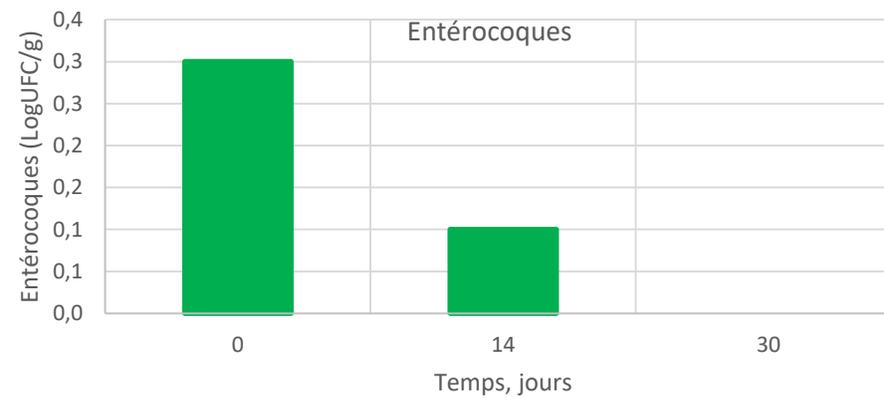
➤ Données de terrain



■ Gomez-Brandon et al., 2016 ■ Nolan et al., 2020



■ Nolan et al., 2020 ■ Goberna et al., 2011 ■ Gomez-Brandon et al., 2016



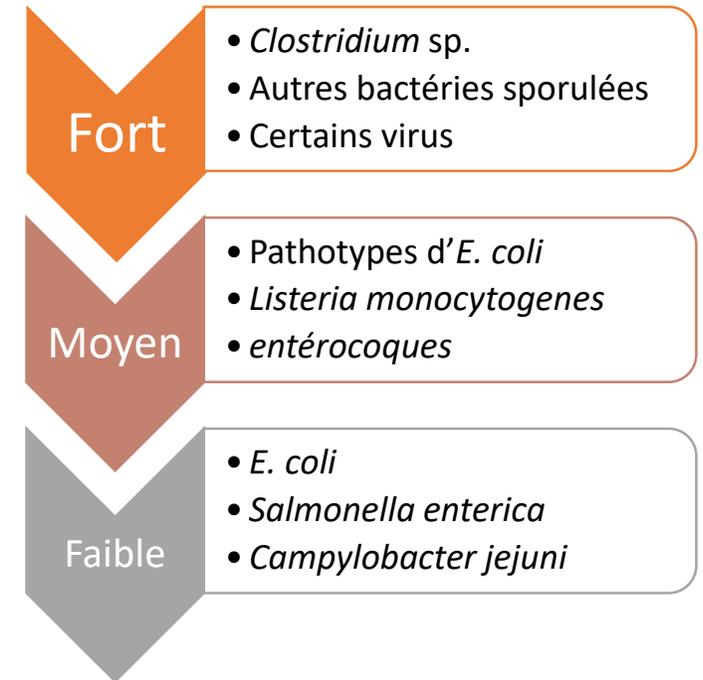
■ Nolan et al., 2020

➤ Temps de survie après épandage

- ✓ Résultats variables selon l'espèce
 - Formes de persistance
 - Compétitivité (registre métabolique, antibiose...)
 - Diversité génomique
- ✓ Résultats variables selon les études
 - Conditions expérimentales
 - Nature du sol
 - Température

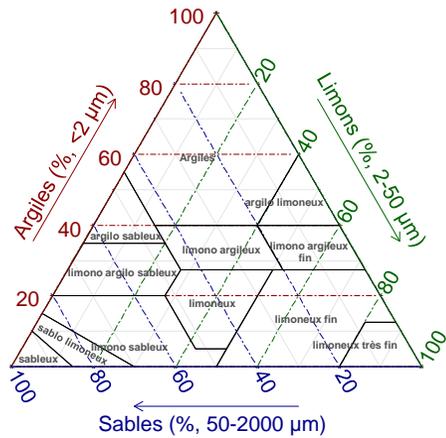


Temps de survie après épandage



➤ Importance des caractéristiques du milieu receveur

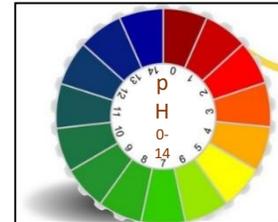
Texture



Teneur en eau



pH



Teneur en matière organique



➤ Caractéristiques physico-chimiques du sol

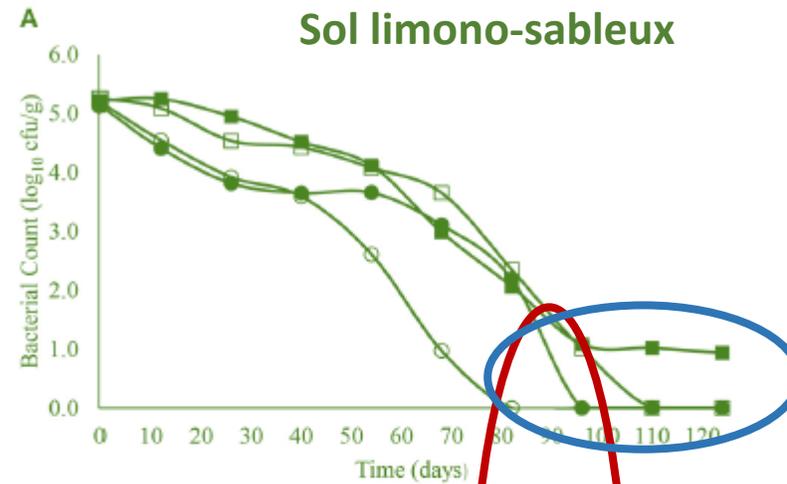
Microcosme de sol

Digestat contaminé artificiellement

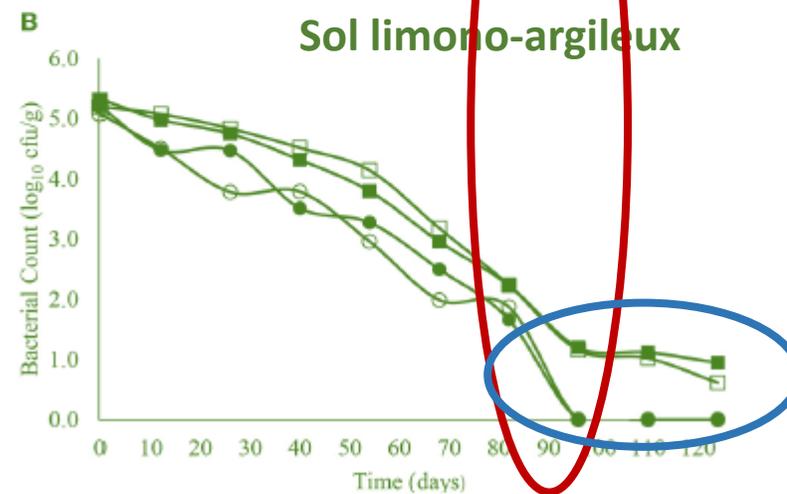
E. coli O157:H7 10⁵ UFC/g

Deux sols avec texture contrastée

E. coli O157:H7



□ Digestat – 4°C
○ Digestat – 14°C



Effet **texture/pH : % argile**
Effet **température : < 20°C**



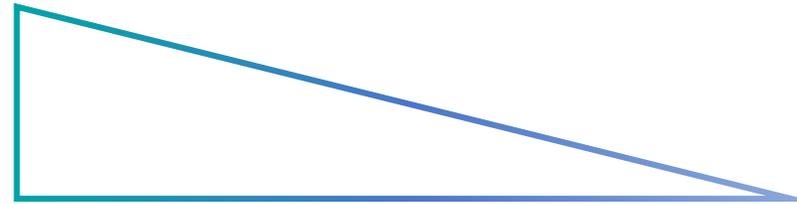
➤ Environnement biotique du sol

Microcosme de sol

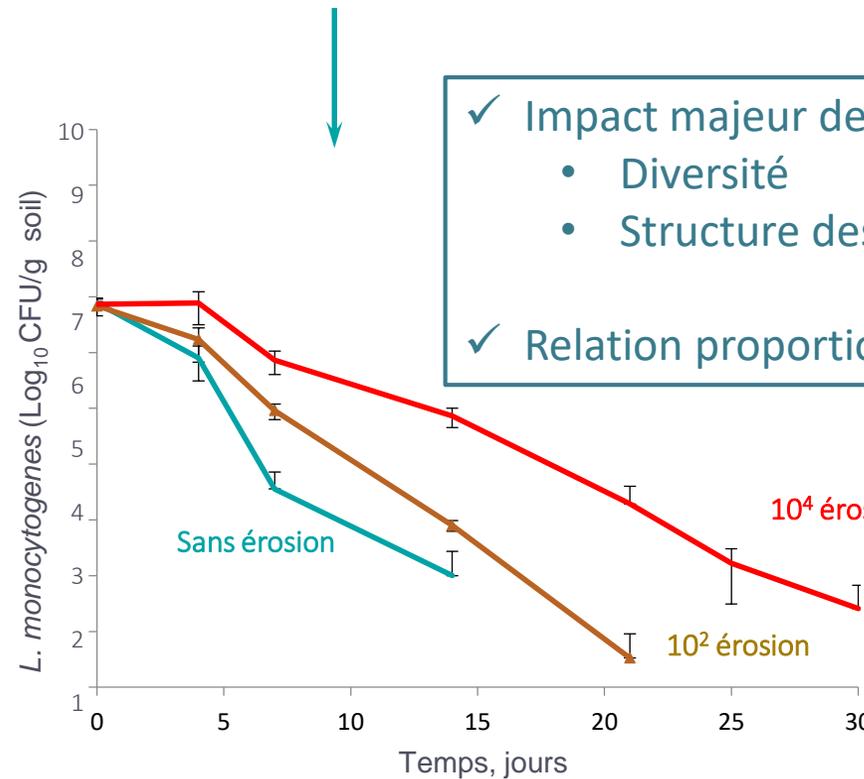
Microcosmes de sol

L. monocytogenes : 10^7 UFC/g

Érosion expérimentale de la diversité



Baisse de la diversité microbienne/ Structure des communautés



- ✓ Impact majeur de l'environnement biotique
 - Diversité
 - Structure des communautés
- ✓ Relation proportionnelle diversité/résistance à l'invasion



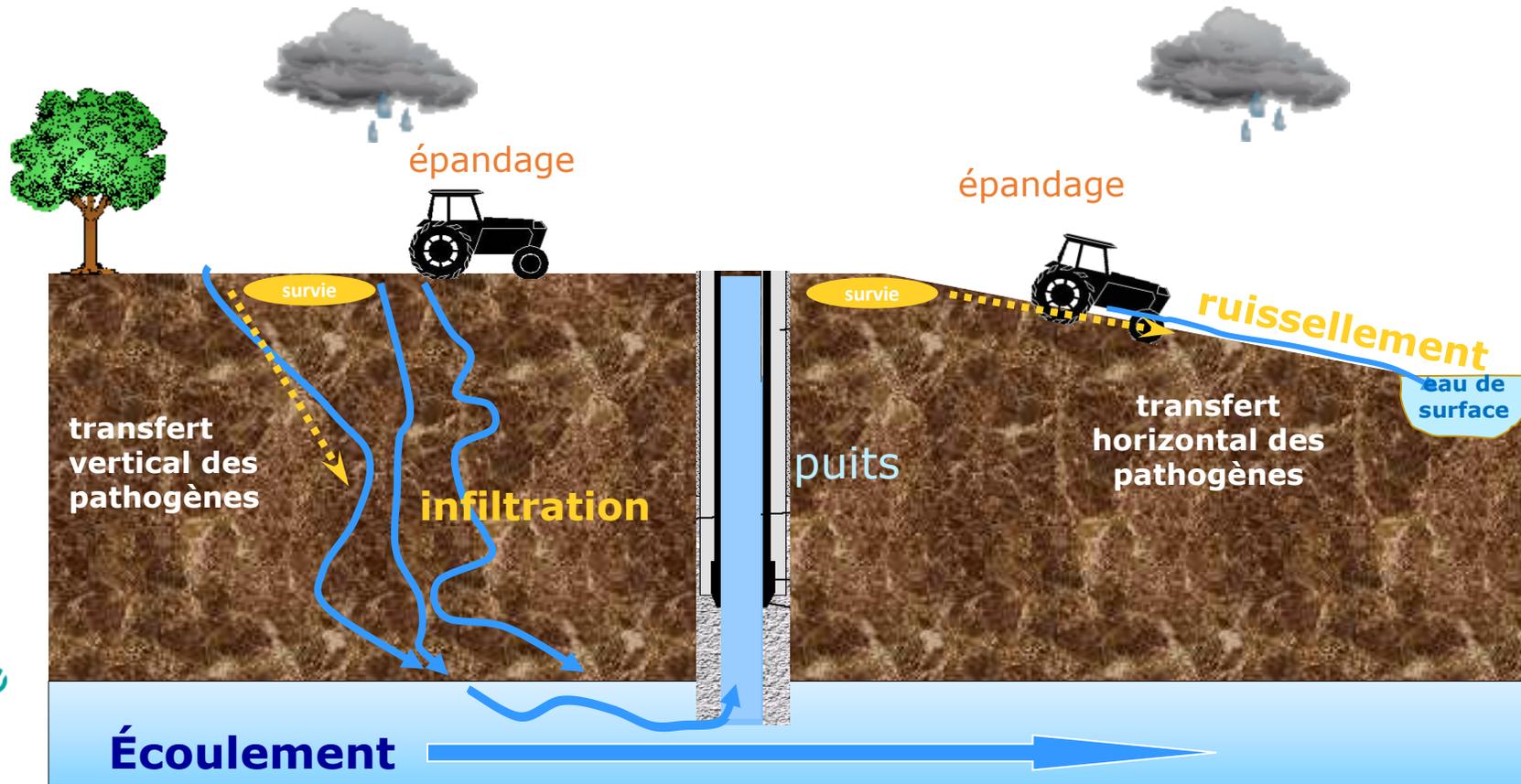
➤ Conditions favorables à la survie dans le sol

Facteurs environnementaux favorables à la survie dans le sol
↘ diversité microbienne/structure des communautés
↗ argiles
↗ taux d'humidité
↗ capacité de rétention en eau
↗ matière organique
Température basse (<20°C)
pH proche neutralité



➤ Caractéristiques physiques de la parcelle

- ✓ Géologie
- ✓ Profondeur de sol
- ✓ Pente



➤ Infiltration

Parcelle expérimentale : pelouse permanente

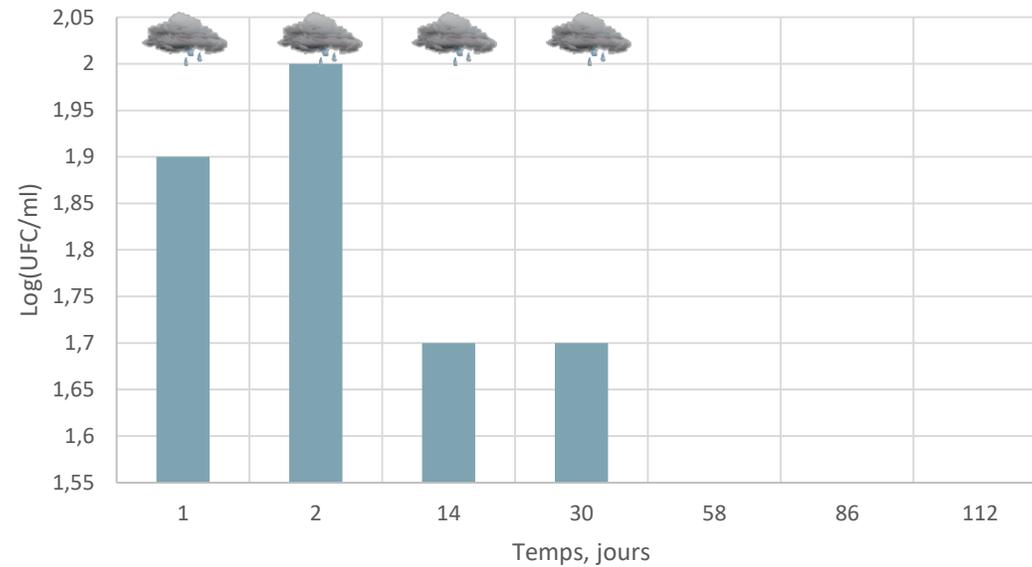
Digestat contaminé artificiellement

Listeria innocua : 10^5 UFC/g

Simulation de précipitations : 11 mm/h pendant 30 min



L. innocua dans le lixiviat



Russel *et al.*, 2022

- ✓ Infiltration pendant 1 mois
- ✓ Respect de la législation impératif



➤ Ruissellement

Parcelle expérimentale : pelouse permanente

Digestat non contaminé artificiellement (1644 g/parcelle)

Digestat traité 1 h, 70°C (1547 g/parcelle)

Digestat traité 96h, 60°C (1440 g/parcelle)

Simulation de précipitations : 4 pluies à 11 mm/h

- Contrôle
- Lisier bovin
- Digestat non traité
- Digestat traité 1h, 70°C
- Digestat traité 96h, 60°C

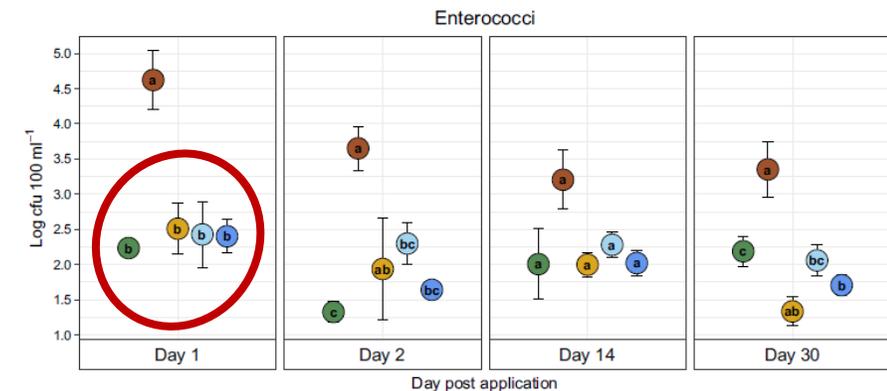
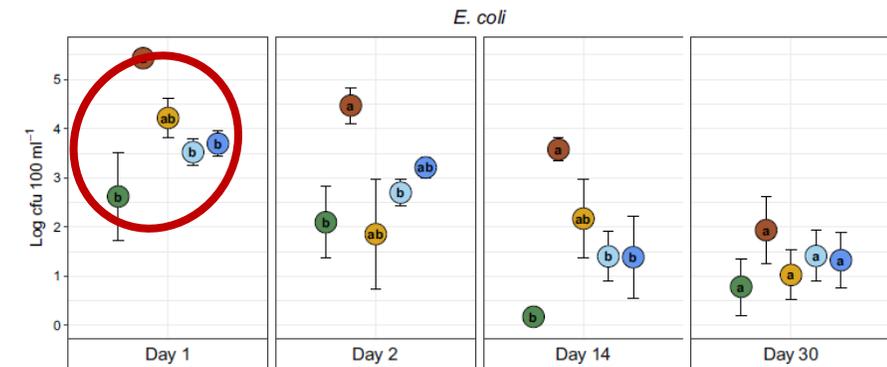
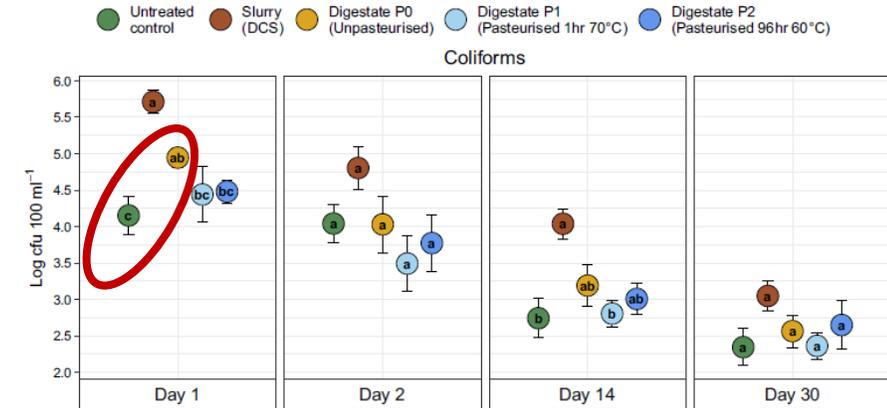
Bactéries indicatrices dans les intrants

	coliformes (log UFC/g)	<i>E. coli</i> (log UFC/g)	entérocoques (log UFC/g)
● Lisier bovin	6,7	6,6	6,0
● Digestat non traité	3,2	2,8	3,3
● Digestat traité 1h, 70°C	0,5	0,0	2,8
● Digestat traité 96h, 60°C	0,0	0,0	1,7

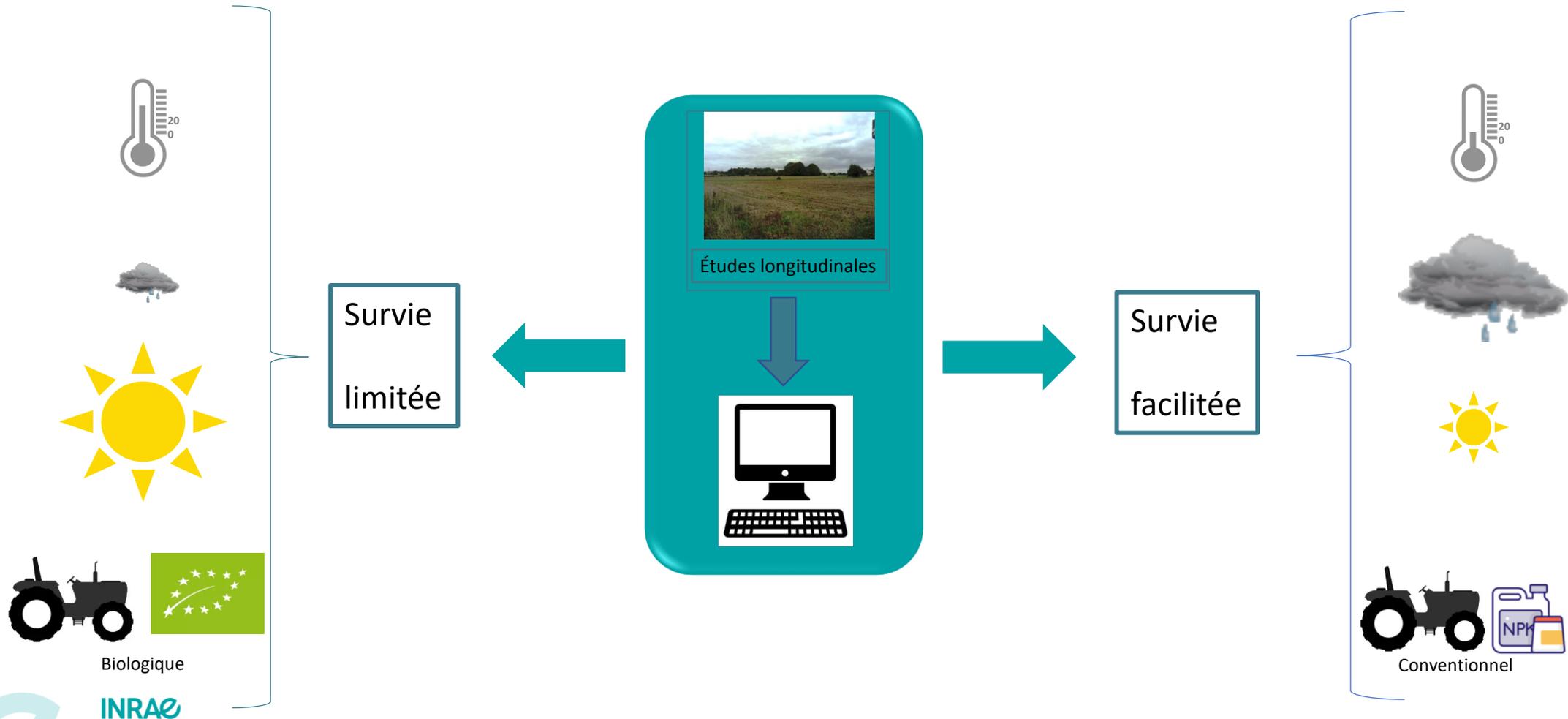
Nolan *et al.*, 2020



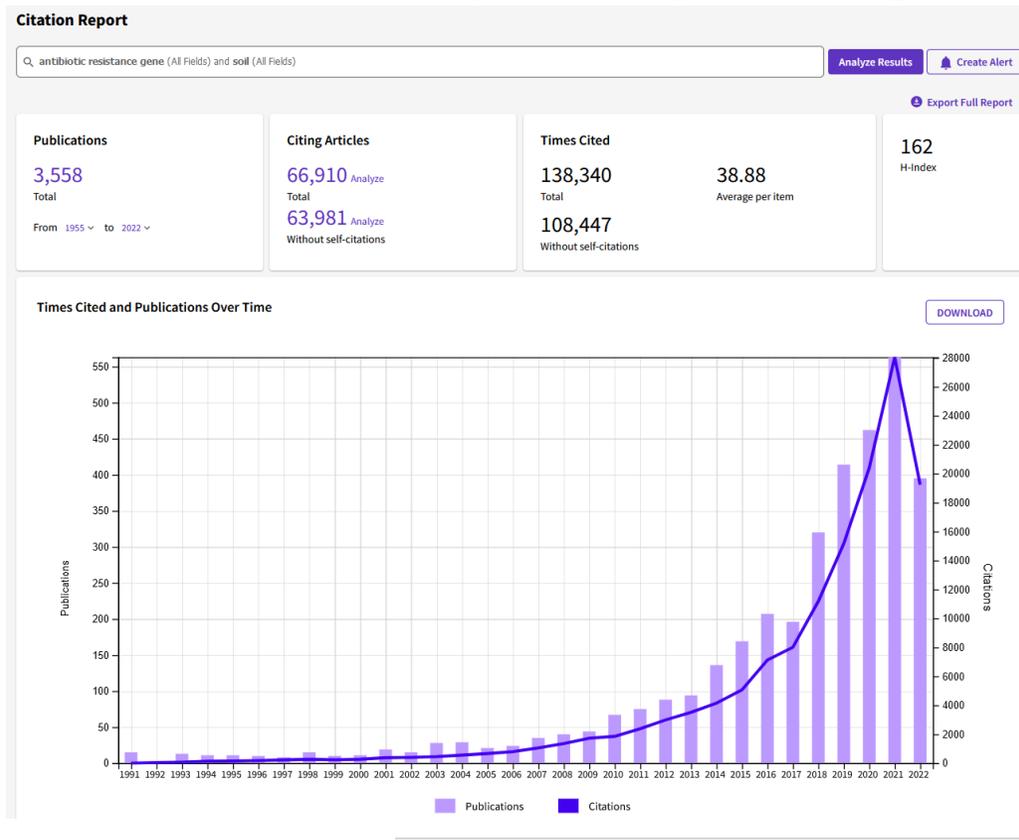
- ✓ Ruissellement transitoire dans les premiers jours
- ✓ Respect de la législation impératif



➤ Les pratiques culturales et la météorologie



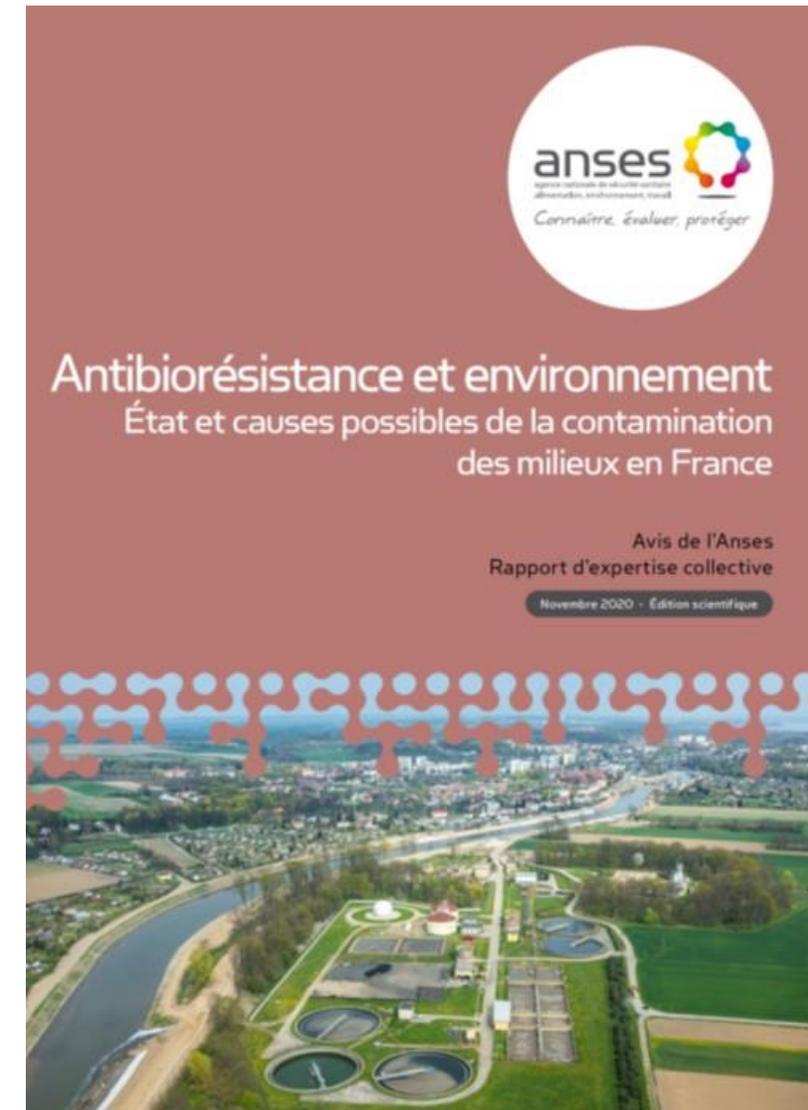
➤ Devenir des GRAs après épandage



➤ Rapport d'expertise Anses

« L'une des questions concerne l'origine de l'enrichissement des GRAs après l'épandage :
proviennent-ils uniquement des PRO et / ou de la multiplication des bactéries du sol, porteuses de ces gènes ?

La croissance de ces dernières serait alors favorisée par l'apport des produits résiduels organiques qui, via l'apport de matière organique et d'éléments nutritifs, modifie la composition des communautés microbiennes du sol. »



<https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf>

➤ Conclusions/réflexions

- ✓ Production de digestats sans indésirables peu envisageable
- ✓ Nécessité de gestion des risques
- ✓ Prise en compte des caractéristiques du milieu receveur nécessaire
- ✓ Meilleure connaissance de l'écologie des pathogènes dans les agroenvironnements
- ✓ Penser flux/transferts
- ✓ Peu/pas de données sur phytopathogènes et pathogènes vétérinaires (hors agents zoonotiques)