



**HAL**  
open science

# Impact de la méthanisation agricole mésophile voie liquide sur le devenir de Clostridia pathogènes et de gènes de résistance aux antibiotiques

Lorine Derongs

► **To cite this version:**

Lorine Derongs. Impact de la méthanisation agricole mésophile voie liquide sur le devenir de Clostridia pathogènes et de gènes de résistance aux antibiotiques. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2021. Français. NNT : 2021NSARB348 . tel-03710198

**HAL Id: tel-03710198**

**<https://theses.hal.science/tel-03710198v1>**

Submitted on 30 Jun 2022

**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.

# These de doctorat de

*L'institut national d'enseignement pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement*  
Ecole interne AGROCAMPUS OUEST

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et alimentation*

Spécialité : « Microbiologie, virologie et parasitologie »

Par

**Lorine DERONGS**

**Impact de la méthanisation agricole mésophile voie liquide sur le devenir de *Clostridia* pathogènes et de gènes de résistance aux antibiotiques.**

**Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15 avril 2021**

**Unité de recherche : OPAALE**

**Thèse N° : n° de série : B-348 et n° d'ordre : 2021-11**

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Sylvie Nazaret Directrice de recherche, CNRS, Lyon  
Nathalie Wéry Directrice de recherche, INRAE, Narbonne

## **Composition du Jury :**

Président Sylvie Nazaret Directrice de recherche, CNRS, Lyon

Examineurs : Nathalie Wéry Directrice de recherche, INRAE, Narbonne  
Edward Topp Directeur de recherche, Agriculture and Agri-Food, Canada  
Olivier Firmesse Ingénieur de recherche, ANSES, Maisons-Alfort  
Sophie Jan Maîtresse de conférences, Agrocampus, Rennes

Dir. de thèse : Anne-marie Pourcher Directrice de recherche, INRAE, Rennes

## **Invitée**

Céline Druilhe Ingénieur en procédé, INRAE, Rennes



# These de doctorat de

L'institut national d'enseignement pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement  
Ecole interne AGROCAMPUS OUEST

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et alimentation

Spécialité : « Microbiologie, virologie et parasitologie »

Par

**Lorine DERONGS**

**Impact de la méthanisation agricole mésophile voie liquide sur le devenir de *Clostridia* pathogènes et de gènes de résistance aux antibiotiques.**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15 avril 2021

Unité de recherche : OPAALE

Thèse N° : n° de série : B-348 et n° d'ordre : 2021-11

## Rapporteurs avant soutenance :

Sylvie Nazaret                      Directrice de recherche, CNRS, Lyon  
Nathalie Wéry                      Directrice de recherche, INRAE, Narbonne

## Composition du Jury :

Président                      Sylvie Nazaret                      Directrice de recherche, CNRS, Lyon

Examineurs : Nathalie Wéry                      Directrice de recherche, INRAE, Narbonne  
Edward Topp                      Directeur de recherche, Agriculture and Agri-Food, Canada  
Olivier Firmesse                      Ingénieur de recherche, ANSES, Maisons-Alfort  
Sophie Jan                      Maîtresse de conférences, Agrocampus, Rennes

Dir. de thèse : Anne-marie Pourcher                      Directrice de recherche, INRAE, Rennes

## Invitée

Céline Druilhe                      Ingénieur en procédé, INRAE, Rennes



# Remerciements

---

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Irstea / INRAE de Rennes dans l'équipe SAFIR de l'Unité de Recherche OPAALE, grâce au support financier de l'Irstea et de La Région Bretagne. Merci à ces deux partenaires de m'avoir fait confiance.

Merci également à Eric Dufour et à Anne Trémier qui m'ont accueillie dans leur unité de recherche.

Mes remerciements vont tout d'abord à celle qui m'a encadrée pendant ces trois courtes années, ma directrice de thèse Anne-Marie Pourcher. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir fait confiance et soutenue durant ces trois années. Merci de ta patience, de ta disponibilité. Tu m'as transmis la rigueur afin d'avoir une vision globale et justifiée de la recherche.

Je remercie le jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, en particulier Nathalie Wéry ainsi que Sylvie Nazaret, de me faire l'honneur de rapporter mon travail.

J'exprime toute ma gratitude à Sophie Jan, Edward Topp et Olivier Firmesse d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également ceux sans qui tous ces travaux n'auraient jamais pu être menés jusqu'au bout : les « Clodettes » comme nous avons été surnommées : Céline, Julie, Lorette, Christine, Mégane, et Caroline. Mais également Maël, Elise, Sacha et Olivier, vous avez été indispensables et ce travail est autant le vôtre que le mien.

Un énorme merci à Céline Druilhe, pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ces trois années et tout le travail fourni sur les réacteurs pilote.

Je souhaiterais remercier aussi les membres de mon comité de thèse et comité de suivi : Michèle Gourmelon, Vincent Cattoir, Patrick Dabert, Caroline Le Maréchal et Olivier Firmesse pour vos remarques qui m'ont permis de toujours voir plus loin et de renforcer les résultats. Merci pour vos sages conseils et les discussions riches et fructueuses que l'on a pu avoir. Vos questions et votre soutien ont été un élément moteur.

Je remercie chaleureusement Alain Hartmann, responsable de l'équipe MERS à INRAE de Dijon, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir conseillée pour la quantification des gènes de résistance aux antibiotiques.

Merci également à Géraldine Dépret et à David Bru de l'INRAE de Dijon pour leurs conseils et leur aide.

À mon coloc de bureau, Clément, les moments chansons du début de thèse pour se motiver resteront gravés à jamais.

Un grand merci aux chercheurs Irstea/ INRAE qui m'ont tous accueillie, les courtes discussions que l'on a pu avoir au détour d'un café ont toujours été très enrichissantes.

Merci à tous les jeunes et moins jeunes avec qui j'ai pu partager des moments moins « professionnels » qui m'ont permis de souffler pendant cette thèse :

- Lorette, Mégane et Julie : Pour toutes ces pauses thés/café, les moments de détente et de rigolades.
- Lorraine, Victor, Stévan et Clément : pour les parties de belote endiablées lors de la pause déjeuner.
- Mélanie mon binôme de jeux : toujours championnes du tournoi ! Et pour tout ce que tu as fait pour moi : les discussions sérieuses et moins sérieuses.
- Charlotte et Younès : pour ces petites pauses fumeurs rassemblant les cheveux « propres » et « sales »
- Amine, Carlos et Henry : pour vos encouragements et conseils.

Je tiens également à remercier mes parents pour leur soutien pendant ces trois années. Je tiens à remercier en particulier mon père qui m'a toujours soutenue durant ces neuf années. Je tiens à te dire que si j'en suis arrivée là, c'est grâce à toi. Tu as toujours cru en moi et tu as toujours fait en sorte que je puisse réaliser mes projets et mes rêves et j'espère que vous serez fiers de mon travail. Merci à ma sœur Céline et mon frère Romain, ainsi que mon neveu Ethan et ma nièce Anaëlle qui m'ont permis lors de mes courts retours en Normandie de penser à autre chose et de profiter du moment présent.

Et enfin, merci infiniment à Thibaut, mon premier pilier, celui-ci qui m'a toujours soutenue et encouragée pendant ces neuf dernières années. Merci à toi d'avoir accepté de m'attendre pendant que je réalisais mes études dans toute la France. Tu as été mon plus grand soutien et ma source de motivation pendant ces trois années. Cette étape de ma vie m'a fait comprendre que si tout s'est bien passé, c'est parce que tu as toujours été à mes côtés.

# Liste des communications relatives à cette thèse

---

## **Publications scientifiques**

- Derongs L.; Druilhe, C.; Ziebal, C.; Le Maréchal, C.; Pourcher, A-M. Characterization of *Clostridium perfringens* Isolates Collected from Three Agricultural Biogas Plants over a One-Year Period. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 5450.
- Derongs L.; Druilhe, C.; Le Maréchal, C.; Barbut, F.; Heurtevent, L.; Buffet, J.; Martin, L.; Ziebal, C.; Poezevara, T.; Rouxel, S.; Houard, E.; Syed Zaidi, R.; Couturier, J.; Pourcher, A-M. Influence of operating conditions on the persistence of indicator bacteria and two pathogenic *Clostridia* in semi-continuous mesophilic anaerobic reactors. *Soumis à Waste Management*.

## **Communication à des congrès nationaux et internationaux**

- Derongs L.; Le Maréchal, C.; Denis, M.; Pourcher, A-M. **2019**. Evaluation of manure and digestate contamination by *Clostridium botulinum* in biogas plant during 1 year. Workshop botulism: public Health risk associated with animal botulism & ANIBIONET final meeting. *Présentation orale*. 28-29 March 2019. Anses Maisons-Alfort.
- Derongs L.; Druilhe, C.; Ziebal, C.; Pourcher, A-M. **2019**. Impact de la digestion anaérobie mésophile sur le devenir de *Clostridium perfringens*. Journées de l'école doctorale EGAAL 2019. *Présentation orale*. 4-5 juillet 2019. Rennes.
- Derongs L.; Druilhe, C.; Martin, L.; Le Maréchal, C.; Denis, M.; Pourcher, A-M. **2019**. Impact of mesophilic anaerobic digestion on toxinotype of *Clostridium perfringens* strains and their antibiotic resistance. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS 2019) *Poster*. 7-11th July 2019, Glasgow, Scotland.
- Derongs L.; Druilhe, C.; Le Maréchal, C.; Heurtevent, L.; Buffet, J.; Martin, L.; Ziebal, C.; Pourcher, A-M. **2019**. Impact de trois paramètres du procédé de méthanisation sur les caractéristiques chimiques et microbiologiques des digestats. Apivale 2019. *Présentation orale*. 19-20 novembre 2019. Rennes.





# Table des matières

---

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : État de l'art .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Production, traitement et valorisation des effluents d'élevage.....</b>	<b>9</b>
1.1. Les contaminations associées aux effluents d'élevage .....	9
1.2. Stockage et traitement aérobie des effluents d'élevage .....	11
1.2.1. Le stockage .....	11
1.2.2. Le compostage.....	11
1.2.3. Le traitement biologique par boues activées .....	12
1.3. La digestion anaérobie des effluents d'élevage .....	12
1.3.1. Les étapes de la digestion anaérobie .....	14
1.3.1.1. L'hydrolyse .....	14
1.3.1.2. L'acidogenèse .....	15
1.3.1.3. L'acétogenèse .....	16
1.3.1.4. La méthanogenèse .....	16
1.3.2. La filière de méthanisation agricole .....	17
1.3.2.1. La voie liquide infiniment mélangée .....	19
1.3.2.2. La voie solide discontinue .....	20
1.3.3. Qualité agronomique du digestat.....	20
1.3.4. Traitement du digestat .....	21
1.4. La réglementation associée aux digestats.....	22
<b>2. Aspect sanitaire des digestats .....</b>	<b>25</b>
2.1. Contamination de l'Homme et de l'environnement <i>via</i> les épandages de digestat .....	25
2.2. Micro-organismes pathogènes présents dans les effluents d'élevage .....	28
2.3. <i>Clostridium perfringens</i> .....	31
2.3.1. Taxonomie et caractéristiques de <i>C. perfringens</i> .....	31
2.3.2. Principales toxines produites par <i>C. perfringens</i> .....	32
2.3.2.1. La toxine $\alpha$ .....	34
2.3.2.2. La toxine $\beta_1$ .....	35
2.3.2.3. La toxine $\beta_2$ .....	36
2.3.2.4. La toxine $\epsilon$ .....	36
2.3.2.5. La toxine $\iota$ .....	37
2.3.2.6. L'entérotoxine ou CPE ( <i>C. perfringens</i> entérotoxine) .....	38
2.3.2.7. Necrotic Enteritis Toxin B-Like (NetB) .....	41
2.3.3. Résistance aux antibiotiques .....	41
2.3.3.1. Le transfert horizontal chez <i>C. perfringens</i> .....	41
2.3.3.2. Les gènes de résistance chez <i>C. perfringens</i> .....	43
<b>3. Antibiorésistance dans les effluents d'élevage .....</b>	<b>44</b>
3.1. Gènes de résistance aux tétracyclines .....	45
3.2. Gènes de résistance aux sulfamides .....	46
3.3. Gènes de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	46
3.4. Gènes de résistance aux macrolides .....	47
3.5. Gènes de résistance aux polymyxines (colistine) et aux quinolones .....	48

<b>4. Impact sanitaire de la digestion anaérobie .....</b>	<b>49</b>
4.1. Impact sur les pathogènes et les indicateurs d'efficacité de traitement .....	49
4.1.1. Facteurs intrinsèques .....	53
4.1.2. Impact de la température .....	54
4.1.3. Impact du TSH et de la charge organique.....	54
4.1.4. Impact des concentrations en AGV et en ammoniac .....	55
4.2. Impact sur les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques	56
<b>5. Objectifs du doctorat.....</b>	<b>59</b>

**Chapitre 2 : Caractérisation d'isolats de *C. perfringens* collectés sur trois unités de méthanisation à la ferme pendant une année.....61**

<b>Avant-propos .....</b>	<b>63</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>64</b>
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>65</b>
2.1. <i>Biogas plants and sample collection</i> .....	65
2.2. <i>Isolation of C. perfringens</i> .....	66
2.3. <i>DNA extraction</i> .....	66
2.4. <i>Determination of the toxin genotype and search for antibiotic resistance genes</i> .....	66
2.5. <i>Testing antimicrobial susceptibility</i> .....	68
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	69
<b>3. Results .....</b>	<b>69</b>
3.1. <i>Toxinotyping of C. perfringens isolates</i> .....	69
3.2. <i>Tetracycline and erythromycin resistance genes of C. perfringens isolates</i> .....	70
3.3. <i>Antimicrobial susceptibility of C. perfringens isolates</i> .....	70
<b>4. Discussion.....</b>	<b>72</b>
4.1. <i>Toxinotyping of C. perfringens isolates</i> .....	72
4.2. <i>Tetracycline and erythromycin resistance genes of C. perfringens isolates</i> .....	72
4.3. <i>Antimicrobial susceptibility of C. perfringens isolates</i> .....	73
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>74</b>
<b>6. References .....</b>	<b>74</b>

**Chapitre 3 : Influence de différents paramètres de la digestion anaérobie sur la persistance de bactéries indicatrices et de deux *Clostridia* pathogènes en réacteurs mésophiles semi-continus .....82**

<b>Avant-propos .....</b>	<b>84</b>
<b>1. Abstract .....</b>	<b>86</b>
<b>2. Introduction .....</b>	<b>87</b>

<b>3. Material and methods .....</b>	<b>89</b>
3.1. Inoculum and influent .....	89
3.2. Experimental procedure in the semi-continuous reactor .....	89
3.3. Thermal pretreatment of the manure .....	90
3.4. Experimental design .....	90
3.5. Physicochemical analysis.....	91
3.6. Microbial analysis .....	91
3.7. DNA extraction, detection of toxin genes and antimicrobial susceptibility .....	92
<b>4. Results .....</b>	<b>93</b>
4.1. Physicochemical parameters.....	93
4.2. Microbial parameters.....	95
4.2.1. Impact of the HRT and of the OLR on bacteria .....	96
4.2.2. Impact of heat pretreatment on bacteria .....	97
4.2.3. Characterization of spore-forming bacteria .....	98
<b>5. Discussion .....</b>	<b>99</b>
5.1. Overall impact of MAD on <i>E. coli</i> and enterococci.....	99
5.2. Overall impact of MAD on <i>C. perfringens</i> and <i>C. difficile</i> .....	100
5.3. Impact of HRT .....	101
5.4. Impact of the OLR.....	102
5.5. Indirect impact of HRT and OLR .....	102
5.5.1. Ammonia content.....	102
5.5.2. VFA content .....	103
5.6. Impact of the heat pretreatment .....	103
<b>6. Conclusion.....</b>	<b>105</b>
<b>7. References .....</b>	<b>105</b>

## **Chapitre 4 : Impact de trois paramètres de la méthanisation mésophile sur la structure des communautés microbiennes et sur les gènes de résistance aux antibiotiques.....116**

<b>Avant-propos .....</b>	<b>118</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>120</b>
<b>2. Matériel et méthode .....</b>	<b>122</b>
2.1. Pilotes.....	122
2.2. Plan d'expérience .....	123
2.3. Analyse des structures des communautés microbiennes .....	123
2.3.1. Extraction d'ADN .....	123
2.3.2. Séquençage et analyse de l'ADNr 16S .....	123
2.4. Quantification de l'ADNr 16S, du gène <i>int1</i> et des GRA.....	124
<b>3. Résultats et discussion.....</b>	<b>125</b>
3.1. Analyse des structures des communautés microbiennes .....	125
3.2. Quantification du gène <i>int1</i> et des GRA dans les digestats.....	129
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>133</b>

5. Références bibliographiques.....	134
6. Annexes .....	140
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>146</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>154</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>184</b>

# Liste des abréviations

---

ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHI	Brain Heart Infusion
BLSE	$\beta$ -lactamases à spectre élargi
BRA	Bactérie(s) résistante(s) aux antibiotique(s)
CDC	Cahier des charges
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPE	<i>C. perfringens</i> entérotoxine
EGM	Élément(s) génétique(s) mobile(s)
ETM	Éléments traces métalliques
GRA	Gène(s) de résistance aux antibiotiques
ICE	Élément intégratif et conjugatif
ICPE	Installations Classées pour la Protection de l'Environnement
IS	Séquence d'insertion
kb	kilobases
LS	Lactosulfite
Mafor	Matières fertilisantes d'origine résiduaire
MS	Matières sèches
NPP	Nombre le plus probable
OTU	Operational Taxonomic unit(s)
pb	Paires de bases
SPAN	Sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
TSC	Tryptone Sulfite-D-Cyclosérine
TSH	Temps de séjour hydraulique
UFC	Unité formant colonie
WICH	Wilkins-Chalgren



# Liste des figures

---

Figure 1. Répartition géographique de la production d'effluents d'élevage récupérables en France en 2000-2001 (Houot <i>et al.</i> , 2014) .....	9
Figure 2: Schéma simplifié de la filière de méthanisation d'après Chen <i>et al.</i> (2014).....	13
Figure 3: Exemple de potentiel méthanogène de différents substrats (source: Solagro 2016) .....	13
Figure 4: Phases de conversion de la biomasse en biogaz d'après Palanichamy et Palani (2014) .....	14
Figure 5: Evolution du nombre d'unités de méthanisation agricole en France depuis 2010 (Source : sinoe).....	18
Figure 6: Répartitions (%) des unités de méthanisation par secteur d'activité et par région (Source : sinoe).....	18
Figure 7: Schéma d'un digesteur en voie liquide infiniment mélangée (Source: Solagro 2011) .....	19
Figure 8: Schéma d'une installation en voie sèche discontinue (Source: Solagro 2011) .....	20
Figure 9: Principaux post-traitements appliqués aux digestats bruts.....	22
Figure 10: Statut réglementaire des digestats. ....	23
Figure 11: Classification des SPAN en fonction de leur risque pour la santé publique ou animale et identification des SPAN admissibles en unité de méthanisation (Source: Ademe 2018).....	24
Figure 12. Voies de dissémination des résidus d'antibiotiques, de bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) et des gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) dans l'environnement d'après Goulas <i>et al.</i> (2018) .....	26
Figure 13: Voies de dissémination des micro-organismes pathogènes, des BRA et des GRA <i>via</i> l'épandage des digestats d'unité de méthanisation agricole, à l'échelle du territoire (adapté de McAllister et Topp (2012)) .....	28
Figure 14: Représentation schématique des cibles et modes d'action des toxines de <i>C. perfringens</i> . 34	
Figure 15: Régulation du gène <i>cpe</i> lors de la sporulation de <i>C. perfringens</i> (Freedman <i>et al.</i> 2016)... 38	
Figure 16: Mécanisme d'action de l'entérotoxine (Navarro <i>et al.</i> , 2018).....	39
Figure 17 Représentation du locus <i>tcp</i> (Li <i>et al</i> 2013).....	42
Figure 18: Abondances de différents GRA (copies/ml ou g) dans les effluents d'élevage (He <i>et al.</i> , 2020).....	45
Figure 19 : Valeurs des abattements de bactéries indicatrices d'efficacité de traitement et de deux pathogènes en batch (A) et en continu (B) en conditions mésophiles .....	53
Figure 20: Abondance relative des GRA dans des digestats issus de 7 méthaniseurs agricoles et de 5 méthaniseurs urbains d'après Luo <i>et al.</i> (2017).....	58
Figure 21: Réacteurs semi-continus utilisés dans le plan d'expérience.....	84
Figure 22: Répartition des ventes vétérinaires en 2019 en tonnage de matière active de chaque famille d'antibiotiques en France. (Source Anses 2020).....	118





# Listes des tableaux

---

Tableau 1: Sous-produits et exemples de genres bactériens intervenant lors de la phase d'acidogenèse d'après Cavinato (2011) .....	15
Tableau 2: Valeurs maximales en bactéries imposées par le CDC dig pour les digestats. ....	25
Tableau 3: Valeurs moyennes, minimales (min) et maximales (max) des prévalences des bactéries zoonotiques, majoritairement responsables de TIAC, dans les fèces animales ou dans les effluents d'élevage. ....	29
Tableau 4: Toxinotypes de <i>C. perfringens</i> et gènes de virulence associés (Li <i>et al.</i> , 2013; Rood <i>et al.</i> , 2018; Uzal <i>et al.</i> , 2018, 2016).....	33
Tableau 5: Principales maladies humaines et animales associées aux toxinotypes de <i>C. perfringens</i> (Freedman <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2013; Petit <i>et al.</i> , 1999; Uzal <i>et al.</i> , 2016).....	33
Tableau 6: Travaux rapportant l'impact de la méthanisation sur les bactéries ( <i>E.coli</i> , coliformes totaux, <i>Salmonella</i> , entérocoques et <i>C. perfringens</i> ) (Adapté de Jiang <i>et al.</i> (2020)) .....	50



## Introduction générale

---



Dans le contexte actuel de lutte contre l'effet de serre, de développement des énergies renouvelables et de valorisation des déchets organiques, la méthanisation à la ferme (ou méthanisation agricole) permet une valorisation des effluents d'élevage et des substrats agricoles, et représente un enjeu majeur pour le secteur agricole. Elle apparaît ainsi comme une des technologies clés de l'économie circulaire et de la croissance verte. Le "Plan Énergie Méthanisation Autonomie Azote" (EMAA), lancé en 2013 par le ministère du Développement durable et le ministère de l'Agriculture, avait pour objectif de développer en France, à l'horizon 2020, 1000 méthaniseurs à la ferme, contre 90 en fin 2012. La loi de transition énergétique pour la croissance verte de 2015<sup>1</sup> a porté le nombre d'unités de méthanisation à atteindre d'ici 2030 à 1500. En 2019, la France disposait de 830 méthaniseurs dont 64,3% étaient des unités de méthanisation à la ferme.

La digestion anaérobie est un processus naturel de transformation biologique de la matière organique en milieu anaérobie, réalisé généralement en condition mésophile (35-40°C) ou thermophile (50-55°C), dans lequel est impliquée une communauté microbienne complexe formant un réseau trophique. Ce processus conduit à la production de biogaz, majoritairement constitué de méthane et de dioxyde de carbone, et d'un sous-produit appelé digestat, valorisable en agriculture pour ses propriétés amendantes et fertilisantes. En France, la majorité des sites de méthanisation agricole fonctionnent en voie liquide infiniment mélangée en condition mésophile. Tous sont alimentés par des effluents d'élevage bovins et/ou porcins auxquels s'ajoutent des co-substrats d'origine végétale.

Malgré leur valeur agronomique indéniable, les digestats restent considérés comme des déchets issus d'installations classées. Leur valorisation est réalisée conformément au code de l'environnement dans le cadre des plans d'épandage. Ils peuvent sortir du statut de déchet et obtenir le statut de produit lorsqu'ils sont transformés en matières fertilisantes. Ils entrent alors dans le cadre du cahier des charges "CDC dig" paru en octobre 2020, de la réglementation de la mise sur le marché des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (AMM), ou lorsqu'ils sont compostés, dans le cadre des normes NFU 44-051, NFU 44-095 ou NFU 42-001. En raison du risque sanitaire associé à la transformation de sous-produits animaux, la méthanisation agricole est concernée par la réglementation européenne relative aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine (SPAN). Celle-ci se compose du règlement européen de principe (CE) n° 1069/2009 et du règlement d'application (UE) n° 142/2011 qui établissent des règles sanitaires applicables aux SPAN. Les effluents d'élevage appartiennent à la catégorie 2 pour laquelle le

---

<sup>1</sup> Loi n° 2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte. L'un de ses objectifs est de favoriser les énergies renouvelables en portant la part des énergies renouvelables à 23% de la consommation finale brute d'énergie en 2020 et à 32% de la consommation finale brute d'énergie en 2030.

règlement n°142/2011 impose une pré-étape de broyage (taille des particules  $\leq 12$  mm) suivi d'un traitement thermique (70°C pendant 1 heure) avant l'entrée dans le méthaniseur. Toutefois, les autorités compétentes peuvent délivrer des dérogations à ce prétraitement. Actuellement en France, la majorité des installations de méthanisation à la ferme ne possèdent pas d'étape de prétraitement thermique bien que celui-ci devienne obligatoire lors du regroupement dans un même méthaniseur d'effluents issus de différents élevages. Il est donc essentiel d'assurer la qualité sanitaire des digestats afin de minimiser le risque de dissémination des micro-organismes pathogènes lors de l'épandage, sans altérer le rendement énergétique de l'installation. Or, de nombreuses questions se rapportant à l'aspect sanitaire des digestats restent encore en suspens. S'il est évident que le degré d'hygiénisation des digestats diffère selon la température mésophile ou thermophile du méthaniseur (Jiang *et al.*, 2020), l'impact des paramètres majeurs du procédé de méthanisation sur la persistance des bactéries pathogènes, tels que le temps de séjour hydraulique (TSH) et la charge organique, reste mal connu, que ce soit pour les formes végétatives ou pour les formes sporulées de bactéries pathogènes. De plus, l'application du prétraitement thermique (70°C, 1h) imposé par le règlement européen, en ne détruisant que les formes végétatives, pourrait favoriser la persistance des bactéries pathogènes formant des spores à l'exemple de *Clostridium perfringens* ou *Clostridioides difficile*.

Dans ce contexte, INRAE Rennes, en collaboration avec l'unité HQPAP de l'Anses de Ploufragan, a initié une étude en 2017 (Projet CloDia, financé par l'ADEME) dans laquelle s'inscrit la thèse, qui avait pour objectif d'acquérir des données sur la qualité sanitaire des digestats issus de méthaniseurs agricoles et de mieux comprendre l'impact des paramètres de gestion de la méthanisation sur les bactéries d'origine entérique et notamment sur deux *Clostridia* productrices de toxines (*C. perfringens* impliqué dans de nombreuses pathologies chez l'Homme et l'animal et responsable de toxi-infections alimentaires et *C. difficile*, bactérie pathogène considérée comme un pathogène émergent chez l'Homme et l'animal).

Outre la dissémination des agents pathogènes, l'épandage répété d'effluents d'élevage peut conduire à une augmentation de l'antibiorésistance dans le sol. Il a ainsi été montré que la teneur en gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) dans les sols et les légumes cultivés sur des parcelles amendées avec des lisiers bovins et porcins était supérieure à celle observée dans les parcelles non amendées (Marti *et al.*, 2013). Il est donc important d'estimer si la méthanisation mésophile permet de réduire les teneurs en GRA dans les digestats. Les quelques données disponibles montrent un impact modéré de la méthanisation mésophile que ce soit à l'échelle du laboratoire (Beneragama *et al.*, 2013) ou de terrain (Tien *et al.*, 2017; Wolters *et al.*, 2016a).

Le travail de thèse avait pour objectifs (i) d'évaluer l'impact de la méthanisation mésophile sur les toxinotypes et les profils d'antibiorésistance d'isolats de *C. perfringens* collectés dans les lisiers et les digestats bruts de trois sites de méthanisation à la ferme, (ii) d'étudier à l'échelle de pilote l'impact de trois paramètres de gestion de la digestion anaérobie sur le devenir de *E. coli*, des entérocoques, de *C. perfringens* et de *C. difficile*, et (iii) d'étudier l'impact de ces paramètres sur les communautés microbiennes et sur l'abondance absolue de GRA.

Le travail présenté dans ce mémoire se décompose en quatre chapitres. Le premier chapitre est constitué d'une synthèse bibliographique. Il permet de situer le contexte de l'étude et de justifier les axes de recherches de la thèse. Après une présentation des procédés de traitement des effluents d'élevage dont la méthanisation, il se focalise sur l'aspect sanitaire des effluents d'élevage par une description des micro-organismes pathogènes (en développant plus particulièrement *C. perfringens*) et des principaux GRA retrouvés dans les effluents. Il se termine par l'impact de la digestion anaérobie sur ces contaminants biologiques.

Le chapitre 2 est consacré à la caractérisation d'isolats de *C. perfringens* collectés pendant une année dans des lisiers et des digestats bruts de trois unités de méthanisation mésophile à la ferme. Il compare la distribution des gènes de virulence et les profils d'antibiorésistance des isolats de *C. perfringens* dans les lisiers et les digestats de ces trois sites.

Le chapitre 3 présente les données d'un plan d'expérience conçu pour étudier l'impact de trois paramètres de gestion de la méthanisation voie liquide sur le devenir de bactéries d'origine entérique. Il décrit les pilotes de méthanisation, alimentés en semi-continu par du lisier de porc et par un co-substrat (aliment pour chevaux) ainsi que les trois paramètres testés (TSH, charge organique et application d'un prétraitement thermique du lisier). Il rapporte les concentrations dans les digestats et les abattements de deux indicateurs d'efficacité de traitement (*E. coli* et entérocoques) et de deux *Clostridia* (*C. perfringens* et *C. difficile*).

Le chapitre 4 présente l'impact de ces paramètres de gestion sur la structure des communautés bactériennes et archéennes des digestats et sur l'abondance de 14 GRA et du gène *intl1*.

Le manuscrit se termine par des conclusions générales et des perspectives du travail de thèse.





## Chapitre 1 : État de l'art

---



# 1. Production, traitement et valorisation des effluents d'élevage

Bien que les volumes exacts d'effluents produits en France soient inconnus, il a été estimé que les quantités annuelles d'effluents d'élevage épandues, de l'ordre de  $10^7$  tonnes de matières sèches, constituent près de 80% des matières fertilisantes d'origine résiduaire (Mafor) valorisées par épandage (Gaillot et Lavarde, 2015). Première région en productions laitière, porcine, de veaux de boucherie, de volailles de chair et d'œufs de consommation, la Bretagne est la principale région productrice de lisiers et de fumier (**Figure 1**) avec un gisement estimé respectivement à 10 et 15 millions de tonnes par an<sup>2</sup>.

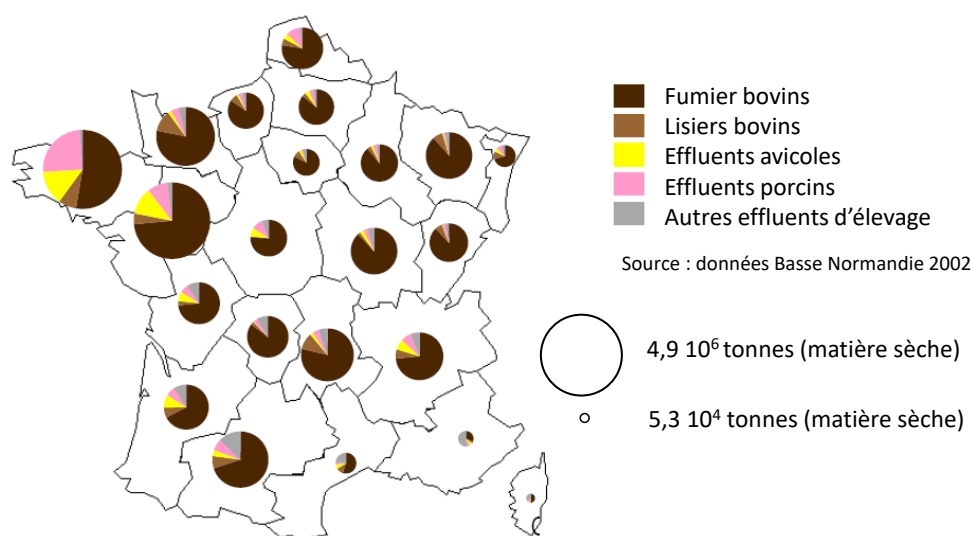


Figure 1. Répartition géographique de la production d'effluents d'élevage récupérables en France en 2000-2001 (Houot *et al.*, 2014)

## 1.1. Les contaminations associées aux effluents d'élevage

Les effluents d'élevage sont à l'origine de contaminations microbiologiques (Cf. § 2) et chimiques.

La majorité des pollutions chimiques, issues de la production, du traitement, du stockage et de l'épandage des effluents d'élevage résulte de pertes de composés azotés et carbonés à l'état gazeux ou sous forme dissoute (Gaillot et Lavarde, 2015). Les émissions gazeuses sont produites dans le bâtiment, au cours de la phase de stockage, et lors de l'épandage alors que les composés sous forme dissoute sont transférés dans les eaux de surface ou souterraines pendant l'épandage (ruissellement) ou après enfouissement (lessivage). Les épandages des effluents d'élevage contribuent aux émissions

<sup>2</sup> <https://draaf.bretagne.agriculture.gouv.fr/Quantite-d-effluents-d-elevage>

de gaz à effet de serre (protoxyde d'azote, méthane et gaz carbonique). De plus, l'émission d'ammoniac dans l'atmosphère participe à l'acidification et l'eutrophisation des milieux. Enfin, les composés organiques volatiles, l'ammoniac et le sulfure d'hydrogène sont à l'origine d'odeurs nauséabondes lors de l'épandage.

Les fumiers, essentiellement d'origine bovine, les lisiers et les fientes sont riches en éléments nutritifs dont les teneurs dépendent de la conduite des élevages. Les teneurs en phosphore et en azote, à l'origine de phénomènes d'eutrophisation, varient en fonction des espèces animales. Lorsque les quantités de phosphore apportées par l'épandage dépassent les besoins des cultures, celui-ci s'accumule dans les sols. Son transfert dans les eaux de surface lors d'épisodes pluvieux est à l'origine des phénomènes d'eutrophisation particulièrement importants dans de nombreux plans d'eau, rivières et zones côtières de Bretagne. La proportion d'ammoniac est assez faible dans les fumiers alors que pour les lisiers et les fientes, une forte proportion de l'azote est sous forme ammoniacale (50 à 70%). L'épandage des lisiers et des fientes conduit donc à des pertes de  $\text{NH}_3$  par volatilisation plus importantes que celles des fumiers. Le pH basique des fumiers peut néanmoins engendrer une volatilisation du  $\text{NH}_3$  dans les heures qui suivent l'apport au sol s'ils ne sont pas enfouis rapidement. Peu représentés dans les lisiers, les nitrates se forment dans le sol après l'épandage sous l'action de bactéries nitrifiantes qui transforment l'azote ammoniacal en nitrites et en nitrates. Ces derniers, plus solubles que l'ion ammonium, sont entraînés par lessivage et ruissellement dans les eaux.

Le cuivre et le zinc, deux éléments traces métalliques (ETM), sont présents dans les effluents d'élevage en raison des compléments alimentaires donnés aux animaux. Les apports répétés d'effluents d'élevage conduisent à une accumulation de ces ETM dans les sols amendés qui dépend du type de Mafor. L'apport de fumier, contrairement au lisier, augmente la capacité d'adsorption des sols vis-à-vis des ETM, diminuant ainsi les transferts potentiels vers les plantes. La mobilité du cuivre dans les eaux du sol est supérieure en cas d'apport de lisier par rapport au fumier, en raison du caractère liquide des lisiers et de leur richesse en carbone organique dissous. Par ailleurs, les apports de lisiers n'augmentent pas le pH du sol, contrairement aux apports du fumier et donc ne permettent pas de diminuer la mobilité du zinc (Houot *et al.*, 2014).

Les composés pharmaceutiques, notamment les hormones, les antibiotiques et leurs résidus sont les contaminants organiques les plus abondants dans les effluents d'élevage. Leur accumulation dans le sol dépend de leurs caractéristiques intrinsèques de persistance et des conditions environnementales (type de sol, température, humidité...) (Houot *et al.*, 2014).

Il est à noter que les nitrates font l'objet d'une réglementation européenne (directive européenne 91/676/CEE dite "directive nitrates"), transcrite en droit Français par le Décret n° 93-1038 dont l'objectif est de réduire la pollution des eaux par les nitrates d'origine agricole. La

Bretagne est classée en zone vulnérable vis à vis du paramètre nitrates depuis 1994 selon les dispositions de cette directive.

## **1.2. Stockage et traitement aérobie des effluents d'élevage**

Bien que la majorité des effluents d'élevage ne subissent qu'un simple stockage, pour répondre aux objectifs des éleveurs (respect de la réglementation nitrates, limitation de l'apport du phosphore, stabilisation de la matière organique, production d'énergie), divers traitements des effluents d'élevage sont proposés à l'exemple du compostage, de la séparation de phases, du traitement par boues activées et de la méthanisation (ou digestion anaérobie).

### **1.2.1. Le stockage**

La durée de stockage diffère selon la réglementation à laquelle est soumise l'exploitation agricole, Règlement Sanitaire Départemental (RSD) ou Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE). Elle est de 1,5 mois pour les élevages soumis au RSD et de 4 mois minimum pour ceux soumis à la réglementation sur les ICPE. Les capacités de stockage précédentes ne s'appliquent pas aux effluents (fumier compact non susceptible d'écoulement ou fientes de plus de 65% de matière sèche) stockés temporairement sur les parcelles d'épandage qui répondent alors aux conditions de stockage aux champs. Les élevages situés en zone vulnérable doivent en plus disposer de stockage complémentaire pour répondre au calendrier d'interdiction des épandages. A titre d'exemple, pour les fumiers et lisiers de bovins laitiers, la durée de stockage est de 4 à 6 mois. Elle est de 7 à 7,5 mois pour les fumiers et lisiers porcins et les effluents d'origine avicole<sup>3</sup>.

### **1.2.2. Le compostage**

Le compostage, utilisé pour les "effluents solides" (fumier, phase solide après séparation mécanique du lisier ou du digestat), permet de stabiliser la matière organique, de réduire les odeurs et de diminuer les teneurs en micro-organismes pathogènes. Il comprend une phase thermophile, d'environ un à deux mois au cours de laquelle le tas est aéré, et une phase de maturation pendant laquelle le tas refroidit et la matière organique se stabilise (Trochard *et al.*, 2019). Il conduit à la formation d'un produit stabilisé, riche en composés humiques et hygiénisé par la montée en

---

<sup>3</sup> [http://www.bretagne.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/guide\\_par6.pdf](http://www.bretagne.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/guide_par6.pdf)

température de la phase thermophile. S'il permet de transformer l'azote organique en  $N_2$ , il produit également du  $NH_3$  et des oxydes d'azote ( $N_2O$ ,  $NO$ ) (Bonneau *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015; Zhu-Barker *et al.*, 2015a, 2015b).

### **1.2.3. Le traitement biologique par boues activées**

Ce procédé, couramment utilisé en Bretagne dans les exploitations porcines, vise à réduire la charge organique et la charge azotée. La matière organique est dégradée par des bactéries hétérotrophes et l'azote est transformé par des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes. Les boues activées, procédés de culture libre en suspension, maximisent le contact entre les bactéries et la matière organique, permettant une optimisation de la dégradation du lisier. Le procédé de boues activées s'intègre dans une chaîne de traitement comprenant le plus souvent une étape d'élimination du phosphore. Associée à un pré-traitement du phosphore par séparation mécanique, la filière par boues activées permet d'abattre de l'ordre de 60% à 70% de l'azote du lisier brut et d'exporter jusqu'à 85% du phosphore (Pigeon, 2010). Le traitement du lisier comprend plusieurs étapes dont certaines sont facultatives. Le lisier est homogénéisé dans une fosse. Une séparation de phase, facultative, réalisée généralement par centrifugation, produit une fraction liquide ainsi qu'un refus solide riche en phosphore destiné à l'exportation. Le lisier brut ou la fraction liquide du lisier est envoyé dans un bassin alternant des phases aérobies et anoxiques afin d'éliminer l'azote sous forme  $N_2$ . Le produit ainsi traité est séparé en deux fractions par décantation ou filtration. Les boues issues de la séparation sont stockées en fosse avant d'être épandues. La fraction liquide est stockée dans une lagune avant de servir pour l'irrigation des cultures.

## **1.3. La digestion anaérobie des effluents d'élevage**

Dans le contexte actuel de développement des énergies renouvelables et de valorisation des déchets organiques, la méthanisation agricole (ou méthanisation à la ferme), en permettant une valorisation énergétique et organique des effluents d'élevage et des substrats agricoles, représente un enjeu majeur pour le secteur agricole. Depuis 2010, la méthanisation est reconnue comme une activité agricole à part entière. En 2013, le "Plan Énergie Méthanisation Autonomie Azote" (EMAA), lancé par le ministère du Développement durable et le ministère de l'Agriculture, avait pour objectif de gérer l'azote dans une logique globale sur les territoires, en valorisant l'azote organique, en particulier celui issu des effluents d'élevage et de développer un "modèle français de la méthanisation agricole" en valorisant l'azote et en favorisant le développement d'énergies renouvelables ancrées dans les territoires. Le plan EMMA visait à développer, à l'horizon 2020, 1000

méthaniseurs à la ferme, contre 90 en fin 2012. Deux ans plus tard, la Loi n° 2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte a porté ce nombre à 1500 à l'horizon 2030.

La digestion anaérobie est un processus naturel de transformation biologique de la matière organique en milieu anaérobie réalisé par une communauté microbienne complexe qui forme un réseau trophique. Ce processus conduit à la production de biogaz majoritairement constitué de méthane et de dioxyde de carbone dont les proportions sont en moyenne de 60 et 40%, respectivement, et d'un sous-produit appelé digestat. Le digestat, constitué de substrats organiques non dégradés et de composés minéraux, est valorisable en agriculture pour ses propriétés amendantes et fertilisantes (**Figure 2**).

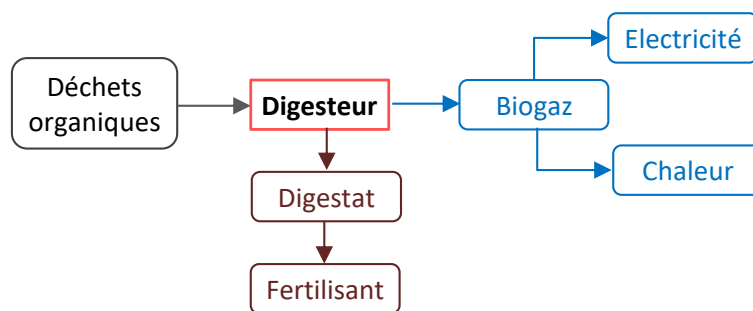


Figure 2: Schéma simplifié de la filière de méthanisation d'après Chen *et al.* (2014)

Les substrats utilisés comme intrants doivent être riches en matière organique biodégradable. Toutefois, leur potentiel méthanogène dépend de leur origine (**Figure 3**) et varie de 10 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/t de lisier porcin à près de 450 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/t de graisses agro-industrielles.

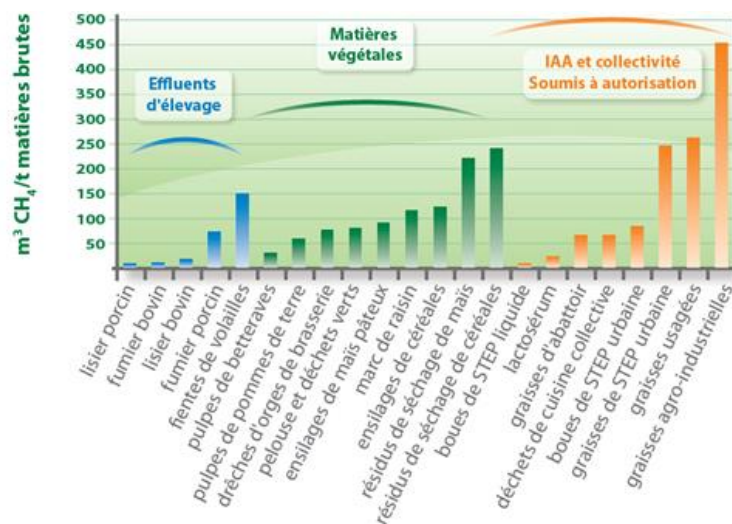


Figure 3: Exemple de potentiel méthanogène de différents substrats (source: Solagro 2016<sup>4</sup>)

<sup>4</sup> [http://www.orne.gouv.fr/IMG/pdf/etude\\_solagro\\_2016\\_cle51cd31.pdf](http://www.orne.gouv.fr/IMG/pdf/etude_solagro_2016_cle51cd31.pdf)



En France, les effluents élevages représentent la base du gisement des méthaniseurs agricoles, mais leur potentiel méthanogène étant faible, ils nécessitent un apport de co-substrats d'origine végétale.

### 1.3.1. Les étapes de la digestion anaérobie

La digestion anaérobie comprend quatre étapes successives, l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse, qui font appel à des micro-organismes interdépendants possédant des métabolismes permettant de s'adapter à l'une ou à plusieurs des phases (**Figure 4**).

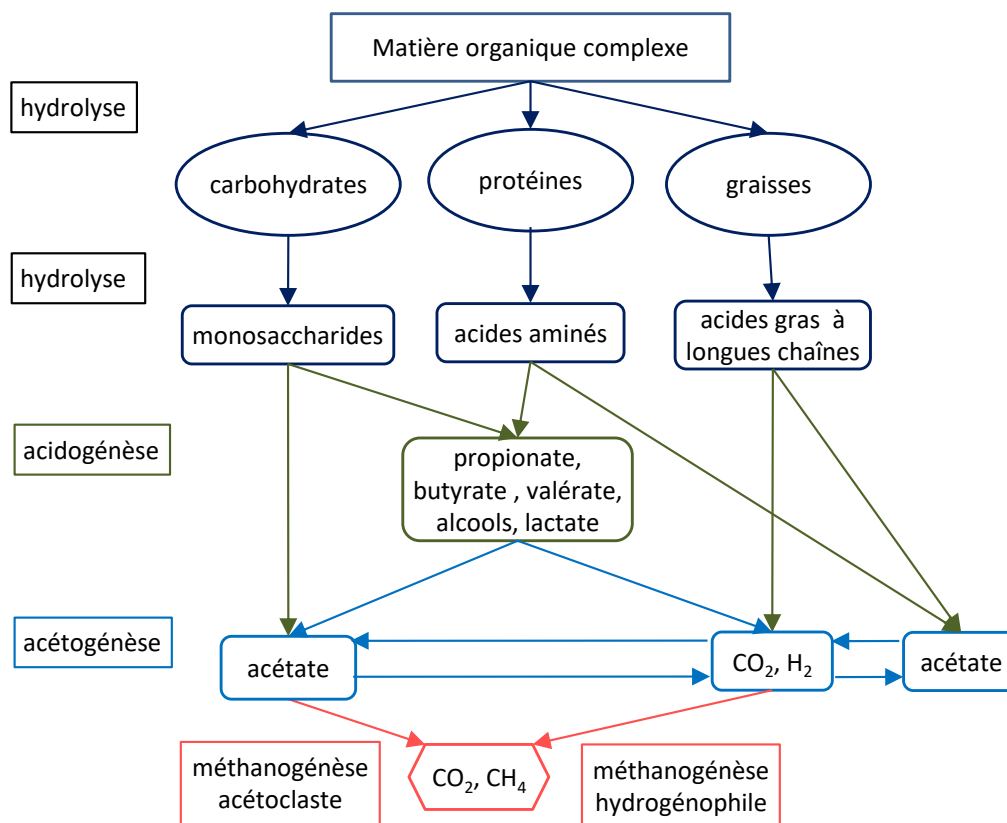


Figure 4: Phases de conversion de la biomasse en biogaz d'après Palanichamy et Palani (2014)

#### 1.3.1.1. L'hydrolyse

La phase d'hydrolyse est la première étape de la digestion anaérobie. Les composés de masse moléculaire élevée (polysaccharides, protéines, lipides) sont convertis en molécules plus petites (monosaccharides, acides aminés, acides gras à longues chaînes) (Palmisano et Barlaz, 1996). Les sous-produits de l'hydrolyse sont utilisés comme source d'énergie par les micro-organismes impliqués dans les étapes ultérieures. L'hydrolyse est catalysée par une large gamme d'enzymes extracellulaires, excrétées par les bactéries hydrolytiques et fermentatives présentes dans le

digesteur (Adekunle et Okolie, 2015; Amani *et al.*, 2010). Le temps de division des bactéries intervenant dans cette étape est de quelques heures (Moletta, 2011). De nombreux genres sont impliqués dans cette étape à l'exemple de *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Proteus*, *Acetovibrio*, *Micrococcus*, *Ruminococcus*, *Propionibacterium*, *Butyrivibrio*, *Mycobacterium*, *Herbinix*, *Cellulosiruptor* et *Cellulomonas* (Amani *et al.*, 2010; Maus *et al.*, 2017; Moletta, 2011). L'hydrolyse est considérée comme l'étape limitante de la digestion anaérobie (Xu *et al.*, 2018), la nature biochimique du substrat et l'accessibilité de la matière organique aux enzymes hydrolytiques, influençant la cinétique de dépolymérisation des macromolécules. Ainsi, la nature récalcitrante des composés cellulosiques ralentit leur vitesse de dégradation (Oosterkamp *et al.*, 2016).

### 1.3.1.2. L'acidogénèse

Cette étape est réalisée par les bactéries qui interviennent dans la phase d'hydrolyse. Toutefois, les phyla dominants de l'étape d'hydrolyse sont les Firmicutes et les *Bacteroidetes* alors que ceux de la phase d'acidogénèse sont les Firmicutes et les Protéobactéries (Xu *et al.*, 2018). Au cours de l'acidogénèse, les monomères produits par l'hydrolyse sont métabolisés en acides organiques à courte chaîne (à l'exemple du lactate), en acides gras volatiles (AGV), en alcools, en cétones, en NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> (**Figure 2** et **Tableau 1**).

**Tableau 1: Sous-produits et exemples de genres bactériens intervenant lors de la phase d'acidogénèse d'après Cavinato (2011)**

Produits	Genres bactériens impliqués dans la production des molécules
Acétone, butanol, éthanol	<i>Clostridium</i>
Acétate, 2,3-butanediol, butylène, éthanol, glycol, lactate, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	<i>Enterobacter</i>
Acétate, butyrate, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	<i>Clostridium</i>
Lactate	<i>Lactobacillus</i>
Acétate, éthanol, lactate, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	<i>Escherichia</i>
Propionate	<i>Propionibacterium</i>

Les réactions d'acidogénèse conduisent à une acidification du milieu. En effet en cas de surcharge organique, l'acidose provoquée par la présence importante d'acétate et d'autres AGV, peut provoquer une inhibition des micro-organismes acétogènes et méthanogènes, et donc un arrêt des processus de digestion anaérobie. Cette étape présente également une sensibilité à la présence de H<sub>2</sub>S, de NH<sub>3</sub>, de sels (Chen *et al.*, 2014; Moletta, 2011) et d'antibiotiques (Carballa *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2020).

### 1.3.1.3. L'acétogénèse

Lors de l'acétogénèse, les acides gras et les alcools sont convertis en acide acétique, en dioxyde de carbone et en dihydrogène (**Figure 4**) (Chen *et al.*, 2014), principaux substrats de la méthanogénèse. Les bactéries intervenant dans cette étape sont classées en trois groupes :

- Les bactéries homoacétogènes qui utilisent des hexoses simples, des composés mono-carbonés et l'hydrogène pour former de l'acétate comme produit exclusif ;
- Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène, dites syntrophiques, qui transforment les AGV en acétate et en dihydrogène ;
- Les bactéries sulfato-réductrices qui peuvent posséder une des fonctions des bactéries précédentes uniquement en présence de sulfates.

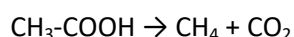
Les réactions biochimiques impliquées sont thermodynamiquement impossibles dans les conditions standards (variation d'enthalpie libre positive). Elles se réalisent si la concentration en H<sub>2</sub> dans le milieu est faible (<10<sup>-4</sup> atm). Pour cela une syntrophie avec d'autres micro-organismes, notamment les méthanogènes hydrogénotrophes ou les bactéries sulfato-réductrices, est nécessaire (Hattori, 2008). La consommation de l'hydrogène par ces dernières permet de maintenir la concentration dans le milieu suffisamment faible pour que la réaction soit thermodynamiquement possible. Les bactéries syntrophiques intervenant dans l'étape d'acétogénèse appartiennent aux genres *Desulfovibrio*, *Aminobacterium* et *Acidaminococcus* (Delfosse, 2011; Moletta, 2011). Les bactéries acétogènes présentent des temps de division supérieurs à ceux des bactéries hydrolytiques (1 à 4 jours). Leur gamme optimale de pH se situe entre 6,8 et 7,5. La phase d'acétogénèse est une étape clé de la digestion anaérobie. En effet l'accumulation d'hydrogène conduit irrémédiablement à l'arrêt de l'acétogénèse (Buffiere *et al.*, 2009), induisant une concentration importante d'AGV et donc une baisse du pH, inhibant ainsi l'étape de méthanogénèse (Moletta, 2011).

### 1.3.1.4. La méthanogénèse

Il s'agit de la dernière étape de la digestion anaérobie. L'acide acétique, le dihydrogène et le dioxyde de carbone sont transformés en méthane par des archées méthanogènes (Chen *et al.*, 2014). Ce sont des archées anaérobies strictes, réparties dans plusieurs ordres : les *Methanobacteriales*, les *Methanococcales*, les *Methanocarsinales* et les *Methanomicrobiales* dont les principaux genres sont *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanotrix*, *Methanomicrobium* et *Methanospirillum* (Chen *et al.*, 2014; Delfosse, 2011; Moletta, 2011).

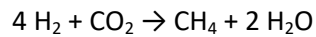
Il existe deux voies principales de formation du méthane :

- La voie acétoclastique dans laquelle l'acide acétique est transformé en méthane :



Cette voie représente entre 65 et 70% du méthane obtenu lors de la digestion anaérobie (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991). Elle est réalisée par les archées acétoclastes qui appartiennent principalement aux genres *Methanotherix* (*M. soehngenii*, *M. concilii*) et *Methanosarcina* (*M. barkeri*, *M. mazei*, *M. acetivorans*) (Delfosse, 2011).

- La voie hydrogénophile dans laquelle le mélange CO<sub>2</sub>/ H<sub>2</sub> est transformé en méthane :



Cette voie est réalisée par les archées hydrogénophiles appartenant essentiellement au genre *Methanobacterium* (*M. formicicum*, *M. wolfei*, *M. alcaliphilum*, *M. voltae*). L'activité des archées méthanogènes hydrogénophiles est importante car elle est responsable de la teneur en hydrogène du milieu et de son maintien à une pression partielle basse. Un dysfonctionnement de cette étape entraîne une augmentation de la pression partielle de l'hydrogène qui est un inhibiteur des bactéries acétogènes, susceptible de bloquer l'acétogénèse et par conséquent, la méthanogénèse (Burton et Turner, 2003; Delfosse, 2011). D'autres voies métaboliques plus marginales existent. Elles impliquent l'utilisation du formate, du méthanol, des méthylamines et des méthylmercaptans (Garcia *et al.*, 2000). Le temps de division des archées est lent (4 à 15 jours). Leur gamme optimale de pH est comprise entre 6,8 et 7,5. Elles présentent une forte sensibilité aux variations de pH, à la température, et aux fortes teneurs de cuivre et de sels (Moletta, 2011).

Les micro-organismes impliqués dans la digestion anaérobie sont sensibles aux variations de température qui affectent la décomposition de la matière organique, et donc la production de méthane (Mao *et al.*, 2015). Il est donc essentiel de maintenir le digesteur à une température constante pour éviter tout choc thermique. En fonction de la température du digesteur, il existe trois types de digestion anaérobie : psychrophile (11-25°C), mésophile (35-40°C) et thermophile (50-55 °C) (Li *et al.*, 2019). En France, la plupart des méthaniseurs à la ferme fonctionnent en mésophilie. Bien que la digestion thermophile permette d'obtenir un meilleur rendement en méthane (Moletta, 2011) et résulte en une meilleure hygiénisation du digestat (Bagge *et al.*, 2005; Sahlström, 2003), celle-ci est très peu développée dans le secteur agricole, la digestion mésophile assurant une meilleure stabilité de la population microbienne et limitant les coûts relatifs à l'apport en chaleur nécessaire pour le maintien de la température du réacteur.

### **1.3.2. La filière de méthanisation agricole**

Depuis les dix dernières années, la filière de méthanisation est en plein essor. En Europe, 18 202 unités de méthanisation étaient comptabilisées en 2018 (dont 11 082 unités agricoles), contre

12 397 (4 778 unités agricoles) en 2011<sup>5</sup>. En France, tout secteur confondu, 830 unités de méthanisation ont été dénombrées en 2019 contre 184 en 2008. La méthanisation agricole est le procédé de digestion anaérobie le plus répandu. Sur les 830 unités de méthanisation, 534 (64,3%) sont des installations à la ferme (**Figure 5**).

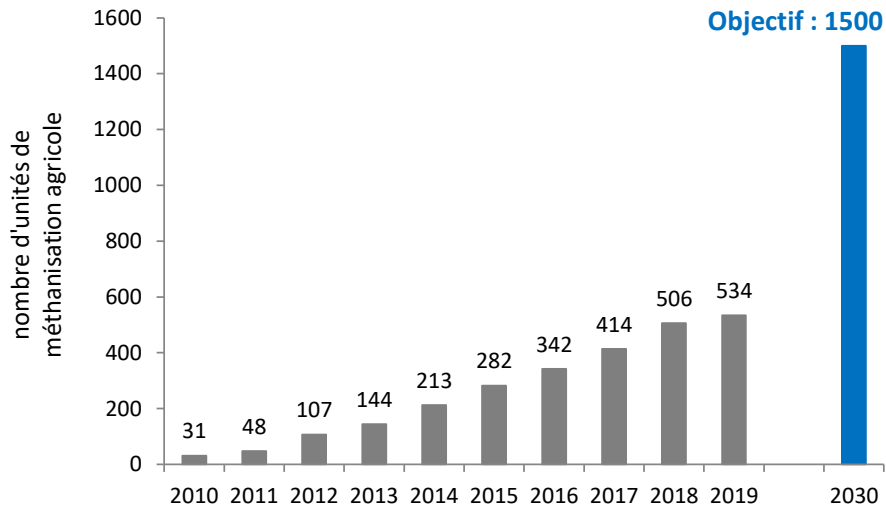


Figure 5: Evolution du nombre d'unités de méthanisation agricole en France depuis 2010 (Source : sinoe<sup>6</sup>)

La Bretagne et le Grand-Est sont les deux régions possédant le plus d'unités de méthanisation (124 et 125, respectivement) tout secteur confondu. La méthanisation agricole représente 85% des installations en Bretagne et 73% dans le Grand-Est (**Figure 6**).

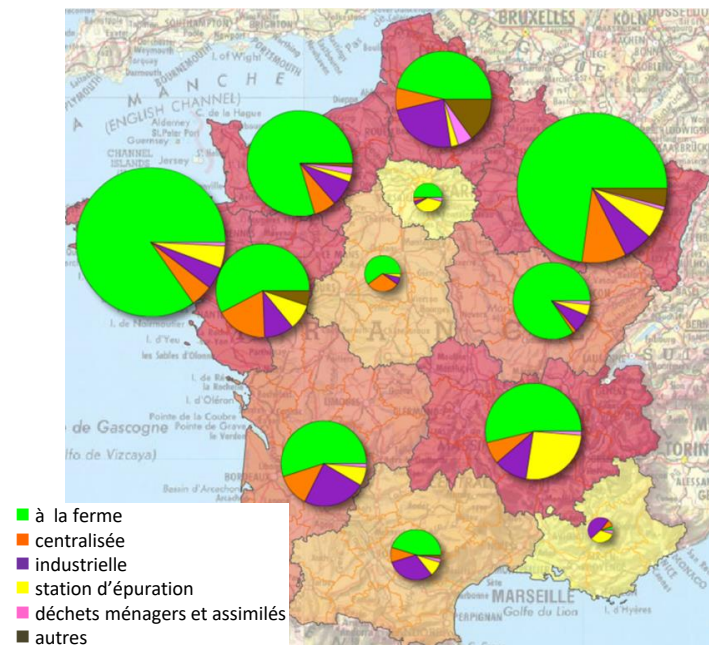


Figure 6: Répartitions (%) des unités de méthanisation par secteur d'activité et par région (Source : sinoe)

<sup>5</sup> European Biogas Association. <https://uabio.org/en/materials/7524/>

<sup>6</sup> <https://carto.sinoe.org/carto/methanisation/flash/>

Le gisement traité dans les unités de méthanisation agricole est composé essentiellement de lisiers et de fumiers (75% des tonnages des intrants)<sup>7</sup> et de co-substrats d'origine végétale qui peuvent être constitués de déchets organiques d'industries agroalimentaires, de résidus de cultures, d'ensilage de maïs ou de tontes de gazon.

La méthanisation agricole se répartit en deux filières principales qui dépendent du type de substrats utilisés et de leurs taux en matières sèches (MS) : la voie liquide infiniment mélangée et la voie sèche discontinue.

### 1.3.2.1. La voie liquide infiniment mélangée

Elle est adaptée aux lisiers qui sont mélangés avec des co-substrats solides (végétaux, fumiers...). La teneur en MS au sein du digesteur doit être inférieure à 12% pour obtenir un mélange qui puisse être pompé et brassé. Les lisiers sont stockés en cuve avant d'être introduits par pompage dans le digesteur alors que les matières solides (végétaux, fumiers) sont chargées par une trémie d'alimentation (**Figure 7**).

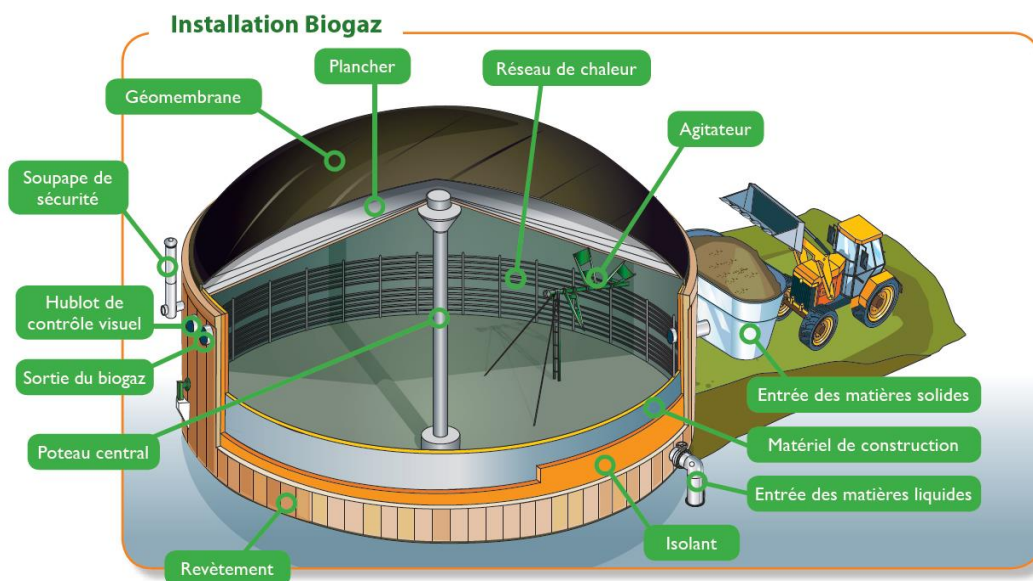


Figure 7: Schéma d'un digesteur en voie liquide infiniment mélangée (Source: Solagro 2011<sup>8</sup>)

Le temps de séjour hydraulique (TSH) est l'un des paramètres majeurs de gestion de la méthanisation voie liquide. Il correspond à la durée théorique de présence des substrats dans le digesteur. Celle-ci est déterminée en fonction du volume du digesteur et du débit d'alimentation. Le TSH est généralement compris entre 40 et 60 jours pour les unités fonctionnant en mésophilie<sup>8</sup>. Le

<sup>7</sup> <https://bretagne-environnement.fr/donnees-gisement-biomasse-bretagne-effluents-elevage>

<sup>8</sup> [https://solagro.org/images/imagesCK/files/publications/f29\\_methanisationalafermesolagrotrameaile20p2011.pdf](https://solagro.org/images/imagesCK/files/publications/f29_methanisationalafermesolagrotrameaile20p2011.pdf)

flux quotidien de matière entrante produit un volume équivalent de digestat qui est stocké dans une fosse ou post-traité (post-digestion, ou séparation de phase mécanique). Un brassage est réalisé afin de mettre en contact les bactéries et le substrat, d'éviter la sédimentation et d'homogénéiser la température dans le réacteur. Il peut être réalisé mécaniquement (pâles avec moteur externe ou hélices avec moteur immergé) ou hydrauliquement pour les mélanges peu chargés en matière sèche (par injection de biogaz ou recirculation de digestat). La température (35-40°C) est maintenue constante pour un développement optimum des bactéries et des archées dans le digesteur.

### 1.3.2.2. La voie solide discontinue

Ce mode de digestion, moins développé que la voie liquide, est représenté par une trentaine de sites en France (Source: sinoe). Il est adapté aux substrats dont le taux de MS est supérieur à 25% tels que les fumiers bovins. Les unités de méthanisation discontinues sont des systèmes biphasiques comportant une phase liquide, le lixiviat, et une phase solide, l'effluent à valoriser (**Figure 8**). Au lancement de la digestion, l'effluent est chargé dans un digesteur hermétiquement fermé. Le lixiviat, initialement stocké dans une cuve, est régulièrement injecté dans le digesteur où il percole à travers le fumier jusqu'à atteindre le fond du digesteur. Afin d'assurer une production de biogaz continue et la plus constante possible, plusieurs digesteurs fonctionnent en parallèle. Lorsque le premier digesteur ne produit plus de biogaz, il est vidé puis rechargé de fumier frais. Le cycle se poursuit de façon similaire avec les autres digesteurs (Degueurce *et al.*, 2016).

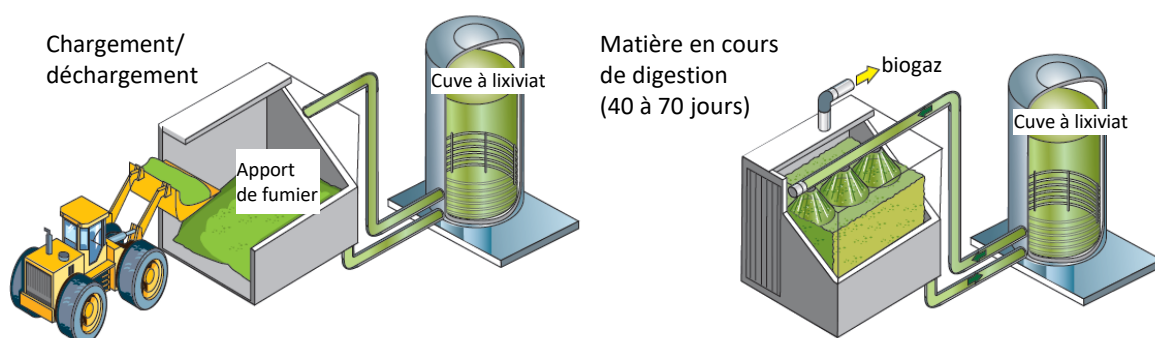


Figure 8: Schéma d'une installation en voie sèche discontinue (Source: Solagro 2011)

### 1.3.3. Qualité agronomique du digestat

Selon la nature des substrats entrant dans le digesteur, une part plus ou moins importante des matières biodégradables est transformée. Au cours de la digestion, le taux d'humification (rapport entre la somme des acides humiques et fulviques, et le carbone organique total) varie peu et la concentration en acides humiques et fulviques diminue. Néanmoins, la digestion permet la

dégradation des molécules facilement dégradables (cellulose, hémicellulose, acides gras), conduisant à augmenter indirectement le coefficient d'humification (efficacité de conversion des apports de carbone frais en carbone humifié) du produit traité (Doublet *et al.*, 2004). Le digestat agricole possède donc une valeur amendante conservée ainsi qu'une valeur fertilisante améliorée grâce à la minéralisation de l'azote sous forme  $\text{NH}_4^+$  (Vaneckhaute, 2017). Lors de la digestion du lisier de porc, plus de 80% de l'azote est disponible sous forme de  $\text{NH}_4^+$ . La concentration totale en phosphore n'évolue pas pendant la digestion, mais la fraction de phosphore lié à la matière organique disponible pour la plante, augmente pendant la digestion. Par ailleurs, les teneurs totales en  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  restent stables lors de la digestion anaérobie (Vaneckhaute, 2017).

La variabilité des intrants définit en grande partie la qualité des digestats. Il a ainsi été montré que l'apport de déchets verts diminue les teneurs en éléments fertilisants (N, P, K) des digestats à base de déjections animales alors que l'apport de sous-produits animaux et de lisier porcin entraîne une augmentation des teneurs de ces éléments fertilisants dans les digestats (Thevenin *et al.*, 2011). Globalement, la minéralisation de l'azote sous forme  $\text{NH}_4^+$  et la diminution de la teneur en matière sèche ont des conséquences positives sur la valorisation agronomique du digestat.

#### **1.3.4. Traitement du digestat**

Certaines installations agricoles sont équipées d'un post-digesteur qui permet de poursuivre la dégradation de la matière organique et de récupérer la fraction de biogaz encore présente dans la fraction digérée. Cette production supplémentaire représente entre 5 et 20% de la production totale en biogaz<sup>9</sup>. Ce post-traitement permet en outre de stabiliser le digestat et d'améliorer son innocuité (Adam et Evanno, 2018). Le digestat issu du digesteur ou du post-digesteur peut être épandu après stockage dans une fosse couverte, limitant la volatilisation de l'azote ammoniacal. En zone vulnérable, afin de limiter l'apport de déjections par rapport aux potentialités locales d'épandage, des techniques de traitement des digestats peuvent être appliquées pour permettre d'exporter la partie excédentaire. Différentes techniques de traitement sont utilisées pour concentrer leurs éléments fertilisants (**Figure 9**). La séparation de phase est un post-traitement couramment utilisé. Elle produit une fraction liquide et une fraction solide (30% de matières sèches) qui sont épandues à des périodes différentes, ou qui subissent des traitements complémentaires en fonction des secteurs géographiques et des excédents en azote des sols. La fraction solide peut être séchée ou compostée. Pour être exportée, elle doit obtenir à une autorisation de mise sur le marché ou répondre aux critères imposés par une norme sur les composts. La fraction liquide, riche en azote ammoniacal,

---

<sup>9</sup> <https://www.ineris.fr/fr/guide-vers-methanisation-propre-sure-durable-recueil-bonnes-pratiques-methanisation-agricole>



peut subir un traitement plus poussé tel que le stripping qui consiste à transformer l'ammoniaque liquide en gaz en jouant sur le pH et la température. Le gaz obtenu est ensuite lavé dans un épurateur avec de l'acide sulfurique. L'azote est revalorisé comme engrais liquide sous la forme de sulfate d'ammonium, de nitrate d'ammonium ou d'une combinaison des deux.

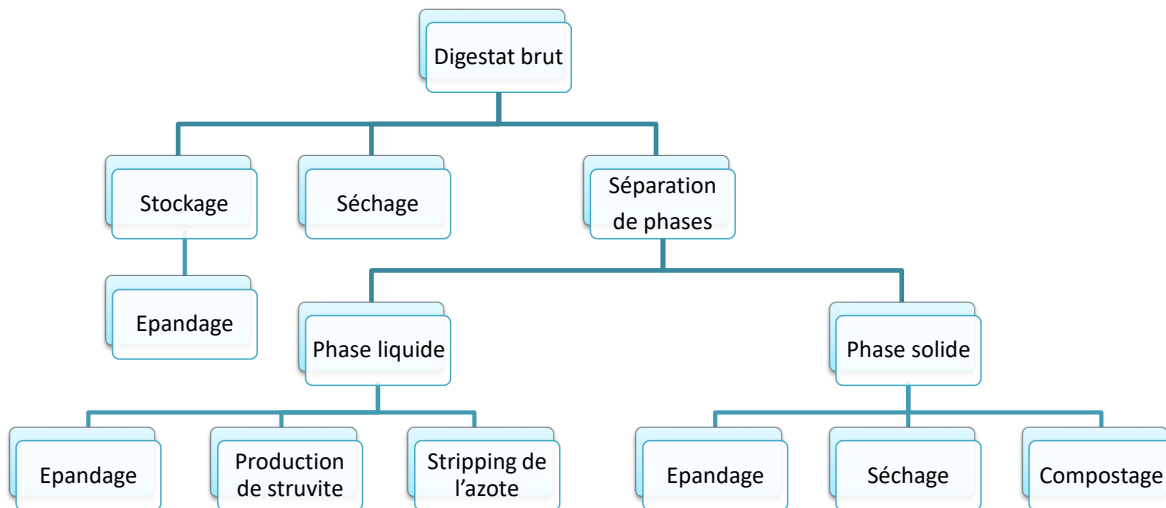


Figure 9: Principaux post-traitements appliqués aux digestats bruts.

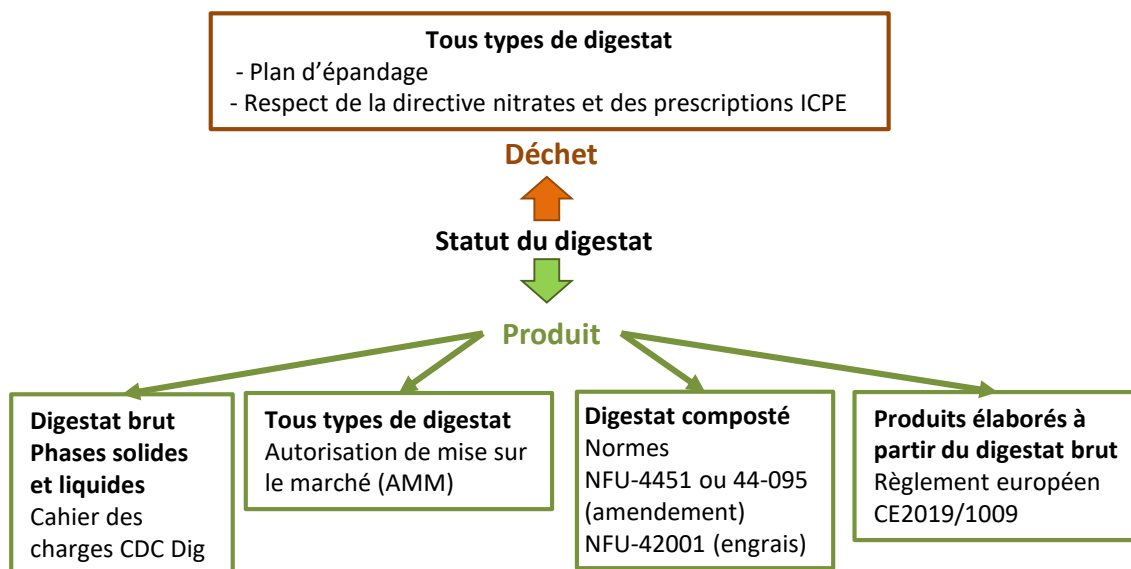
Il est aussi possible de récupérer une partie du phosphore en mélangeant la phase liquide du digestat à de la soude caustique et à du chlorure de magnésium. Le phosphate se lie au magnésium et à l'azote pour former de la struvite qui est un cristal minéral.

## 1.4. La réglementation associée aux digestats

Une rubrique ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) n°2781, spécifique à la méthanisation, a été créée par le Décret n° 2009-1341 en 2009. Actuellement, le régime de l'installation (autorisation, enregistrement ou déclaration) définit les règles procédurales à respecter pour avoir le droit d'exploiter une unité de méthanisation ainsi que les mesures à respecter durant l'exploitation. L'origine et la nature des déchets traités ainsi que la taille de l'installation orientent le classement ICPE de l'unité. Lorsque les intrants sont constitués de matière végétale brute, d'effluents d'élevage, de matières stercoraires, de lactosérum et de déchets végétaux d'industries agroalimentaires, les trois régimes dépendent de la quantité de matières à traiter : autorisation ( $\geq 100$  t/j), enregistrement ( $\geq 30$  t/j et  $< 100$  t/j) et déclaration ( $< 30$  t/j). Par ailleurs, les sites de méthanisation doivent obligatoirement disposer d'un agrément sanitaire pour le traitement des sous-produits animaux.

Malgré leur valeur agronomique, les digestats restent considérés comme des déchets issus d'installations classées. Leur valorisation est réalisée conformément au code de l'environnement

dans le cadre des plans d'épandage. Ils peuvent obtenir le statut de "produit" lorsqu'ils sont transformés en matières fertilisantes. Ils entrent alors dans le cadre du cahier des charges (CDC) dig<sup>10</sup>, de la réglementation de la mise sur le marché des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (AMM), ou lorsqu'ils sont compostés, dans le cadre des normes NF U44-051, NF U44-095 ou NFU 42-001 (**Figure 10**). Une autre voie permettant de sortir du statut de déchet sera possible en 2022 pour certains produits formulés à partir de digestat s'ils sont conformes au Règlement Européen CE 2019/1009<sup>11</sup>.



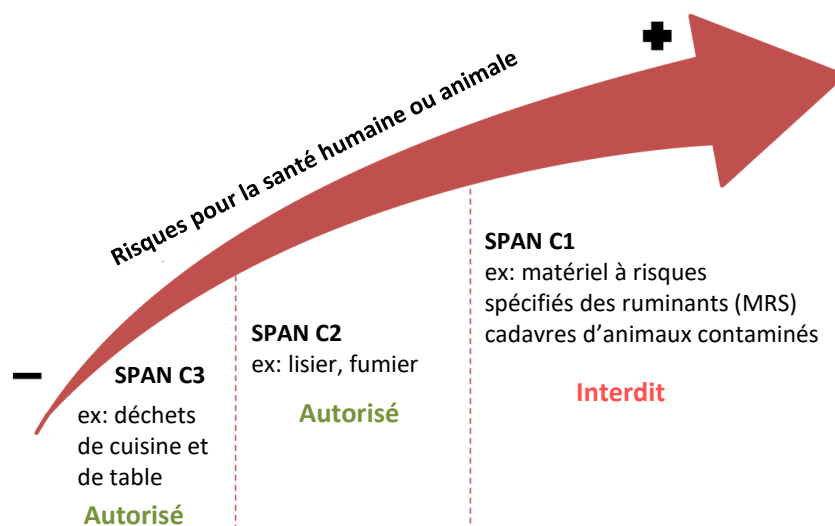
**Figure 10: Statut réglementaire des digestats (digestat brut: digestat issu du digesteur ou du post-digesteur, stocké ou non en fosse) (D'après la source: <https://aile.asso.fr/biogaz/ressources-outils/le-digestat/>).**

La présence de micro-organismes pathogènes dans les effluents d'élevage (fumiers et lisiers) introduits dans les méthaniseurs constitue un risque sanitaire pour l'homme et l'animal. En effet, le retour au sol du digestat sur des cultures ou des pâturages peut conduire à une dissémination des agents pathogènes dans l'environnement agricole et contaminer les animaux d'élevage et l'homme (Fröschle *et al.*, 2015). En raison du risque sanitaire associé à la transformation de sous-produits animaux, la méthanisation agricole est concernée par la réglementation européenne relative aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine (SPAN). Celle-ci

<sup>10</sup> Arrêté du 22 octobre 2020 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation d'intrants agricoles et/ou agro-alimentaires en tant que matières fertilisantes.

<sup>11</sup> Règlement (UE) n° 2019/1009 du 05/06/19 établissant les règles relatives à la mise à disposition sur le marché des fertilisants UE, modifiant les règlements (CE) n° 1069/2009 et (CE) n° 1107/2009 et abrogeant le règlement (CE) n° 2003/2003. L'Union européenne a adopté le 5 juin 2019 le nouveau Règlement « Fertilisants » 2019/1009 : il est entré en vigueur le 16 juillet 2019 et sera d'application au 16 juillet 2022. Il concerne l'ensemble des engrais et des amendements de sol, que leur origine soit issue de l'extraction, de procédés chimiques, ou encore de matières recyclées ou organiques.

se compose du règlement européen de principe (CE) n° 1069/2009 et du règlement d'application (UE) n° 142/2011<sup>12</sup> qui établissent des règles sanitaires applicables aux SPAN. Trois catégories de SPAN y sont définies en fonction d'un niveau de risque biologique, chimique et physique (**Figure 11**). Les effluents d'élevage appartiennent à la catégorie 2 pour laquelle le règlement d'application (UE) n°142/2011 impose une pré-étape de broyage (taille des particules  $\leq 12$  mm) suivie d'un traitement thermique (70°C pendant 1 heure) des effluents avant l'entrée dans le méthaniseur. Toutefois, les autorités compétentes peuvent délivrer des dérogations à ce prétraitement.



**Figure 11: Classification des SPAN en fonction de leur risque pour la santé publique ou animale et identification des SPAN admissibles en unité de méthanisation (Source: Ademe 2018<sup>13</sup>)**

Actuellement en France, la majorité des installations de méthanisation alimentées par des effluents d'élevage porcins et bovins fonctionnent en mésophilie, ne possèdent pas d'étape de prétraitement thermique, à l'exception des sites de méthanisation collectifs regroupant des effluents de différents élevages, et produisent des digestats qui conservent en général un statut de déchet dans la mesure où ils sont rarement transformés. Les digestats issus des méthaniseurs à la ferme sont le plus souvent épandus directement ou après stockage en fosse, sans autre traitement que la digestion anaérobie mésophile. Il est donc essentiel d'assurer la qualité sanitaire des digestats afin de minimiser le risque de dissémination des micro-organismes pathogènes lors de l'épandage sans altérer le rendement énergétique de l'installation.

<sup>12</sup> Règlement (CE) n° 1069/2009 du parlement européen et du conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine. Règlement (UE) n° 142/2011 modifié de la commission du 25 février 2011 portant application du règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement Européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine.

<sup>13</sup> Guide d'accèsion à l'agrément sanitaire pour le traitement de sous-produits animaux carnés. <https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/guide-agrement-sanitaire-compostage-201805-rapport.pdf>

Il convient de souligner que les textes réglementaires ou les normes auxquels se rattache le digestat par son statut, possèdent des critères microbiologiques. Ainsi, la plupart des digestats issus des unités de méthanisation agricole doivent répondre aux critères imposés par le CDC dig qui sont similaires à ceux du Règlement (UE) n° 2019/1009 (**Tableau 2**).

**Tableau 2: Valeurs maximales en bactéries imposées par le CDC dig pour les digestats.**

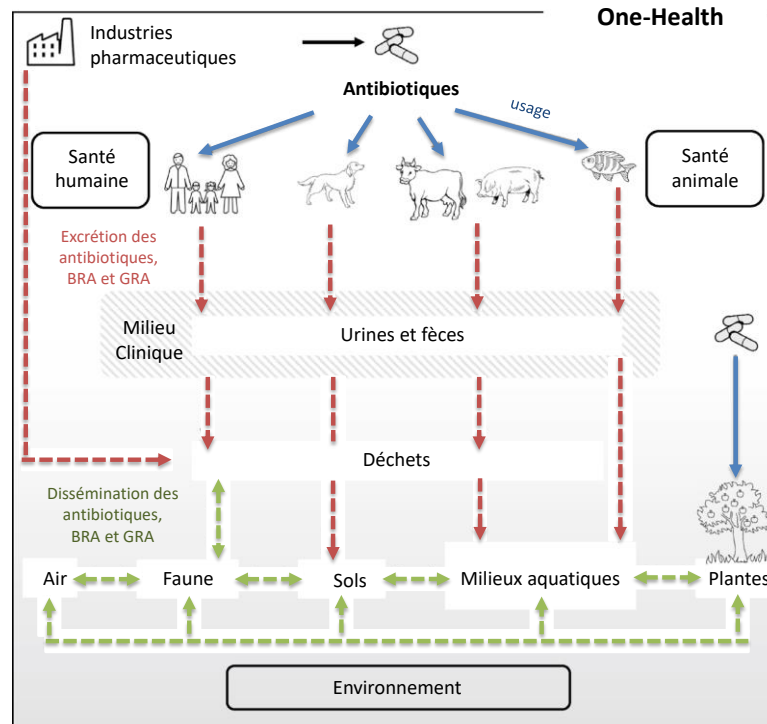
Paramètre	Poids de l'échantillon	Nombre d'échantillons	M (valeur seuil)	M (valeur maximale)	c <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> ou entérocoques	1 g	5	1000	5000	1
<i>Salmonella</i>	25 g	5	0	0	0

<sup>a</sup> nombre d'échantillons dans lesquels le nombre de bactéries peut se situer entre m et M. Le résultat est satisfaisant si le nombre de bactéries des 5 échantillons est inférieur ou égal à m. Il est non satisfaisant si le nombre de bactéries est supérieur ou égal à M dans au moins 1 échantillon.

## 2. Aspect sanitaire des digestats

### 2.1. Contamination de l'Homme et de l'environnement *via* les épandages de digestat

Le besoin croissant en énergie renouvelable a fortement stimulé la méthanisation agricole ces dernières années. Or, l'épandage du digestat, susceptible de contenir des contaminants, peut avoir un impact direct ou indirect sur la santé humaine, animale et environnementale. Le retour au sol des effluents d'élevage et notamment des digestats, est indissociable du concept "One health" utilisé pour décrire le principe selon lequel "*la santé humaine et la santé animale sont interdépendantes et liées à la santé des écosystèmes dans lesquels elles coexistent*". Outre les pathogènes, la présence de résidus antibiotiques et de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'élevage est particulièrement préoccupante, l'antibiorésistance représentant "*l'une des menaces les plus sérieuses pour la santé publique*" selon l'Organisation Mondiale de la Santé. La problématique de l'antibiorésistance n'est pas uniquement associée aux traitements administrés aux animaux d'élevage. Celle-ci est en effet la conséquence de l'utilisation excessive d'antibiotiques non seulement en santé animale mais également en santé humaine, entraînant la sélection de bactéries résistantes et leur dissémination par transmission directe au sein des populations humaines et animales, et indirecte *via* l'environnement (**Figure 12**).



**Figure 12. Voies de dissémination des résidus d'antibiotiques, de bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) et des gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) dans l'environnement d'après Goulas *et al.* (2018)**

L'utilisation d'antibiotiques conduit à la sélection de variants résistants qui s'accumulent dans le microbiote intestinal humain ou animal. De plus, selon Gothwal et Shashidhar (2015), 80% des antibiotiques utilisés en élevage sont excrétés dans les urines et les matières fécales. Les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) et leurs gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) se retrouvent ainsi dans les eaux usées urbaines, les boues de station de traitement des eaux usées ainsi que dans les effluents d'élevage destinés à être épandus ou à être valorisés par méthanisation et/ou compostage (Fröschle *et al.*, 2015; Lloret *et al.*, 2013a, 2013b; Menardo *et al.*, 2011; Moset *et al.*, 2015; Scaglia *et al.*, 2014).

Les effluents épandus représentent donc un risque sanitaire dans la mesure où ils contiennent non seulement des BRA mais également des résidus d'antibiotiques (Oliver *et al.*, 2020; Stalder *et al.*, 2012; Tennstedt *et al.*, 2003; Van den Meersche *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2019). Ces derniers se retrouvent dans l'environnement à des concentrations sub-inhibitrices trop faibles pour induire la mort des bactéries. À ces concentrations, les résidus d'antibiotiques peuvent être absorbés par les végétaux et induire une pression de sélection suffisante favorisant le maintien de la résistance chez les BRA (Menz *et al.*, 2019; Oliver *et al.*, 2020). Après épandage, les micro-organismes pathogènes et les BRA peuvent être transférés lors d'épisodes pluvieux dans les eaux de surface par ruissellement ou dans les eaux souterraines par lixiviation. Les animaux d'élevage ainsi que la faune sauvage qui se

contaminent par un contact direct avec le digestat épandu sur les sols et les prairies, ou indirectement lors de l'abreuvement dans des eaux contaminées, peuvent à leur tour disséminer les agents pathogènes et les BRA dans l'environnement. De plus, les bactéries présentes dans le sol et les eaux sont susceptibles de développer une antibiorésistance au contact des BRA et des résidus d'antibiotiques apportés par les épandages. La transmission de la résistance peut être accrue par la pression sélective due à la présence d'antibiotiques dans l'environnement, ce qui augmente l'ampleur et la propagation de la résistance (He *et al.*, 2020; Menz *et al.*, 2019). Des échanges génétiques peuvent contribuer à la propagation et la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement.

Les GRA sont véhiculés par des structures, appelées éléments génétiques mobiles (EGM) codant leur propre mobilité intra- ou inter-génomique (Villa *et al.*, 2019). Les EGM comprennent les intégrons de classe 1, 2 ou 3, les séquences d'insertion, les transposons, les plasmides conjugatifs et/ou mobilisables et les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) (Davies and Davies, 2010; Frost *et al.*, 2005; Merlin et Toussaint, 1999; Villa *et al.*, 2019). Les EGM ne sont pas nécessairement des structures isolées les unes des autres. Ainsi, un intégron peut se trouver dans un transposon ou un transposon dans un plasmide conjugatif. Cet empilement ou agrégation d'éléments, participe à la plasticité des génomes et joue un rôle important dans la mobilité des gènes entre bactéries et donc à la propagation des GRA dans l'environnement (Adams *et al.*, 2018; Davies and Davies, 2010; Oliver *et al.*, 2020).

Si l'épandage des digestats ne représente à l'échelle globale qu'une très faible part de la quantité de pathogènes et de BRA émise dans l'environnement, à l'échelle du territoire, il joue un rôle central dans leur dissémination (**Figure 13**). Le digestat est considéré comme un biofertilisant mais le degré de stabilité de la matière organique, la valeur agronomique et la qualité sanitaire doivent être respectés pour que le recyclage agricole du digestat soit durable (Albuquerque *et al.*, 2012). Une mauvaise gestion des effluents d'élevage et des digestats peut engendrer un problème de santé publique en facilitant la transmission de maladies zoonotiques, avec des conséquences économiques (pertes dans la production animale) et environnementales (contamination des installations et des produits finaux). Lors du retour au sol des digestats, les agents pathogènes d'origine entérique porteurs ou non de gènes de résistance aux antibiotiques, peuvent être inactivés sous l'action combinée de facteurs intrinsèques au micro-organisme et de facteurs environnementaux tels que le pH, la température, l'action des U.V., l'humidité, la teneur en carbone, la disponibilité des nutriments et les effets antagonistes des micro-organismes (Semenov *et al.*, 2008).

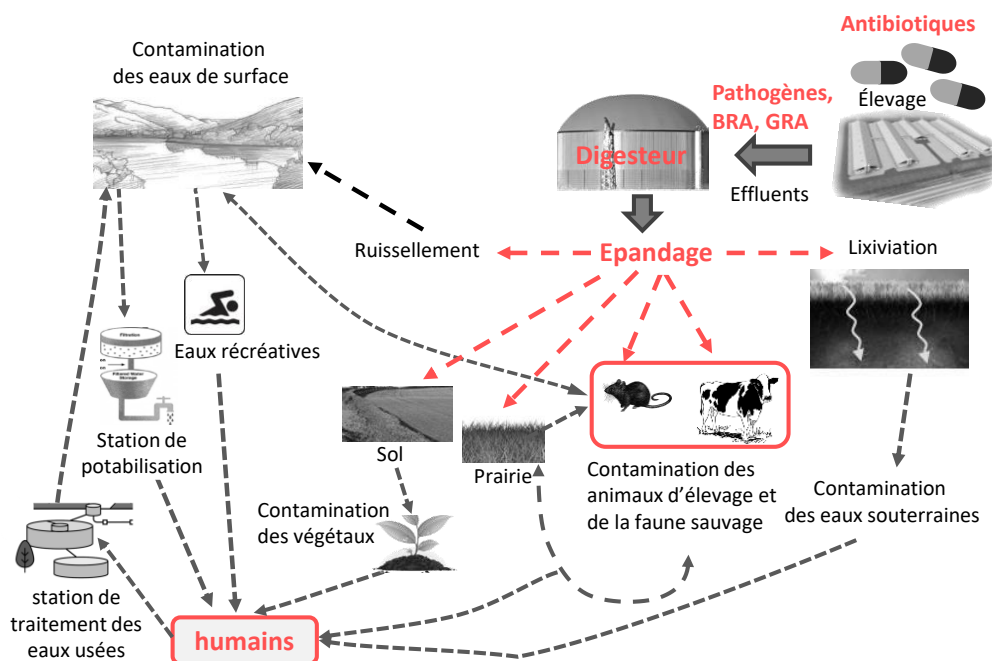


Figure 13: Voies de dissémination des micro-organismes pathogènes, des BRA et des GRA via l'épandage des digestats d'unité de méthanisation agricole, à l'échelle du territoire (adapté de McAllister et Topp (2012)).

Les facteurs environnementaux étant difficilement contrôlables, il est important d'agir avant le retour au sol des digestats afin de limiter la dissémination des micro-organismes pathogènes. En amont du méthaniseur, la propagation des agents pathogènes dans les déjections animales peut être réduite grâce à l'assainissement des exploitations et par la prise de mesures strictes de biosécurité (EFSA, 2019; Staggemeier *et al.*, 2015). Il est également possible de réduire les concentrations en micro-organismes pathogènes en agissant sur les paramètres de la méthanisation (Cf. § 4).

## 2.2. Micro-organismes pathogènes présents dans les effluents d'élevage

Les données de la littérature scientifique sur la prévalence des micro-organismes pathogènes dans les intrants et les digestats des unités de méthanisation agricole sont peu abondantes et portent essentiellement sur les bactéries à l'exemple de *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157, des campylobacters thermotolérants, *Listeria monocytogenes* (Tableau 3) ou *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Chiapetta *et al.*, 2019). Il existe très peu de données sur la prévalence des virus et des protozoaires. La présence d'entérovirus bovin (BEV) a été mise en évidence dans des digestats de deux sites de méthanisation agricole mésophiles fonctionnant en voie liquide ou en voie sèche (Chiapetta *et al.*, 2019). *Cryptosporidium* et *Giardia* dont la fréquence de détection était faible ( $\leq 5\%$ ) dans les 20 échantillons de lisier de porcs alimentant des pilotes psychrophiles n'ont pas été retrouvés dans les digestats (Côté *et al.*, 2006). Les travaux scientifiques portant essentiellement sur

les bactéries pathogènes responsables de zoonoses impliquées dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) (*Salmonella*, *E. coli* productrices de shigatoxines, campylobacters, *L. monocytogenes*), seule la prévalence de celles-ci est détaillée (**Tableau 3** et **Annexe 1**).

**Tableau 3: Valeurs moyennes, minimales (min) et maximales (max) des prévalences des bactéries zoonotiques, majoritairement responsables de TIAC, dans les fèces animales ou dans les effluents d'élevage.**

Origine	Nombre d'études <sup>a</sup> et prévalence	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> O157	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> thermotolérant	<i>L. monocytogenes</i>
porcin	<b>nb études</b>	<b>11 (616)<sup>b</sup></b>	<b>1 (6)</b>	<b>6 (171)</b>	<b>2 (139)</b>	<b>3 (81)</b>
	Moyenne (%)	50,2	nd <sup>c</sup>	34,1	48,3	26,1
	Min (%)	1,6		nd	11,9	18
	Max(%)	89		91	84,6	33,3
bovin	<b>nb études</b>	<b>6 (647)</b>	<b>7 (1532)</b>	<b>1(2)</b>	<b>4 (281)</b>	<b>1 (2)</b>
	Moyenne (%)	29,3	26,7	100	61,6	nd
	Min (%)	6,6	nd		32	
	Max(%)	56	52		97,9	
volaille	<b>nb études</b>	<b>8 (913)</b>	<b>2 (463)</b>	absence	<b>1 (34)</b>	<b>1 (34)</b>
	Moyenne (%)	34,9	0,3	de données	25,5	26,5
	Min (%)	2,9	0			
	Max(%)	100	0,5			

<sup>a</sup> Les prévalences détaillées et la liste des références associées à chaque type d'effluent sont reportées en **Annexe 1**.

<sup>b</sup> nombre total d'élevage analysés, toutes études confondues; <sup>c</sup> non détecté

La fréquence de détection de *Salmonella* dans les fèces et les effluents d'élevage varie de 1,6% (Hölzel and Bauer, 2008) à 100% (Santos *et al.*, 2005). Bien que cette bactérie pathogène soit associée à la volaille (Gu *et al.*, 2019), elle est présente dans les effluents d'élevage porcin à des prévalences atteignant 89% (McLaughlin *et al.*, 2009) et 56% (Callaway *et al.*, 2005) dans les fèces de bovins. Les prévalences de *E. coli* O157 et de *Y. enterocolitica*, bactéries pathogènes associées aux bovins et aux porcs, respectivement, diffèrent selon les études. Elles sont présentes dans les fèces de bovins à des fréquences comprises entre 9% (Schouten *et al.* 2005) et 78% (Busato *et al.*, 1999) et entre 9% (Côté *et al.*, 2006) et 91% (Létourneau *et al.*, 2010) dans les effluents d'élevage porcin. Les données sur les campylobacters et *L. monocytogenes* sont plus rares. Les campylobacters sont présents dans les effluents et les fèces des animaux des trois types d'élevage avec une fréquence de détection atteignant 84,6% (effluents d'élevage porcins), 97,9% (fèces de bovins) et 25,5% (fientes de volailles) (Chinivasagam *et al.*, 2004, Englen *et al.*, 2007, Esteban *et al.*, 2008). *L. monocytogenes* est retrouvée à de faibles prévalences ne dépassant pas 33,3% des effluents (Orzi *et al.*, 2015).



La présence de ces bactéries pathogènes dans les effluents d'élevage utilisés comme intrants des méthaniseurs agricoles soulève des questions sur l'innocuité des digestats destinés à être épandus. Alors que la majorité des études portent sur des bactéries zoonotiques non sporulantes, l'impact de la méthanisation sur les bactéries pathogènes anaérobies formant des spores est peu documenté. Cependant, ces bactéries méritent une attention particulière en raison des conditions anaérobies retrouvées dans les digesteurs. L'anaérobiose, associée à une température mésophile ou thermophile et à une matrice riche en matière organique, représente un environnement propice à la croissance des *Clostridia* qui sont d'ailleurs des bactéries actives dans les 1<sup>ères</sup> étapes de la digestion anaérobie (Lei *et al.*, 2019). Il est donc possible que ces conditions favorisent également la survie, voire le développement, des *Clostridia* pathogènes à l'exemple de *Clostridioides difficile* ou de *Clostridium perfringens*, deux bactéries ubiquistes productrices de toxines. Les *Clostridia* sont par ailleurs suspectées de jouer un rôle dans la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques dans les sols amendés par des effluents d'élevage (Lau *et al.*, 2017; Leclercq *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2018).

*C. difficile*, bactérie productrice de trois toxines majeures (l'entérotoxine A, la cytotoxine B et une toxine binaire dont le rôle n'est pas élucidé) (Schwan *et al.*, 2009), est considérée comme un pathogène émergent chez l'homme et l'animal. Depuis une dizaine d'années, une augmentation de l'incidence des infections humaines à *C. difficile* a été rapportée, ainsi qu'une augmentation de la virulence des souches et de leur résistance aux antibiotiques (Alvarez-Perez *et al.*, 2009). Le portage de *C. difficile* est bien documenté chez les porcs et les bovins (Martín-Burriel *et al.*, 2017; Rodriguez *et al.*, 2017). Le ribotype 078, prédominant chez les animaux d'élevage, a été associé à des cas humains (Turner *et al.*, 2019). *C. difficile* a également été isolé dans des eaux usées urbaines, des rivières (Romano *et al.*, 2018), des sols (Janezic *et al.*, 2016), des effluents d'élevage et des digestats de méthaniseurs agricoles (Fröschle *et al.*, 2015; Le Maréchal *et al.*, 2020, 2019).

*C. perfringens*, bactérie productrice de 17 toxines impliquées dans des infections humaines ou animales (Revitt-Mills *et al.*, 2015), est fréquemment retrouvée dans les effluents d'élevage (Bagge *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2012; Le Maréchal *et al.*, 2019; Massé *et al.*, 2011; Orzi *et al.*, 2015; Pourcher *et al.*, 2012; Thurston-Enriquez *et al.*, 2005) à des concentrations nettement plus élevées que *C. difficile*. Dans une étude menée sur les effluents de cinq élevages par Le Maréchal *et al.* (2019), leurs concentrations respectives variaient entre  $2,4 \cdot 10^3 - 6,4 \cdot 10^5$  UFC/g et  $<1,3-3,1 \cdot 10^2$  NPP/g. En raison de sa pathogénicité, de sa présence à de fortes concentrations dans les effluents d'élevage, de sa résistance aux traitements appliqués aux effluents (Massé *et al.*, 2011; Pourcher *et al.*, 2012; Thurston-Enriquez *et al.*, 2005) et de sa capacité de survie dans les sols amendés avec des Mafor (Gómez-Brandón *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2017; Scott *et al.*, 2018), *C. perfringens* présente un enjeu à

la fois de santé publique, de santé animale et de contamination environnementale. Pour cette raison, cette bactérie est au centre d'un projet de recherche mené par INRAE de Rennes (projet CloDia) sur lequel s'est appuyé le travail de thèse. Les caractéristiques de cette bactérie sont détaillées ci-après.

### ***2.3. Clostridium perfringens***

Selon les données de Santé publique France<sup>14</sup>, en 2019, *C. perfringens* occupait le 4<sup>ème</sup> rang des bactéries pathogènes incriminées dans les TIAC déclarées aux Agences Régionales de Santé et/ou aux DD(CS)PP<sup>15</sup>. Au total, 957 cas confirmés et 687 cas suspectés de TIAC à *C. perfringens* ont été déclarés en 2019 (21% et 8% des TIAC totales). En institut médico-social, *C. perfringens* est suspecté ou confirmé dans 19% des TIAC. Il convient de souligner que de nombreux foyers étant non déclarés ou non diagnostiqués, le nombre de cas est probablement plus élevé. Les TIAC à *C. perfringens* sont majoritairement associées à la consommation de plats composés ou de plats cuisinés (65% du nombre de TIAC déclarées) et dans une moindre mesure à la consommation de viande (15% des TIAC) et de volaille (11% des TIAC).

#### ***2.3.1. Taxonomie et caractéristiques de C. perfringens***

Le genre *Clostridium* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des *Clostridia*, à l'ordre des *Clostridiales* et à la famille des *Clostridiaceae* (Guo *et al.*, 2020; Prescott *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2021). Il est représenté par des bacilles à Gram positif, souvent mobiles, anaérobies stricts, aérotolérants et formant des endospores. Le genre *Clostridium* comprend près de 200 espèces identifiées sur la base de caractères biochimiques et enzymatiques, dont seulement quelques-unes sont pathogènes pour l'Homme (Guo *et al.*, 2020). La classification des espèces s'appuie sur différents critères : (i) sur les caractères biochimiques qui différencient 15 taxons (Seo *et al.*, 2021), (ii) sur la similarité des gènes codant l'ARNr 16s qui différencie 19 clusters (Guo *et al.*, 2020), et (iii) sur des analyses métagénomiques (Cruz-Morales *et al.*, 2019). Selon Cruz-Morales *et al.* (2019), la diversité génotypique des espèces incluses dans la définition actuelle du genre *Clostridium* n'est pas compatible avec la définition du genre et nécessite une révision de la classification. Toutefois, les

---

<sup>14</sup> Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2019. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/toxi-infections-alimentaires-collectives/documents/bulletin-national/surveillance-des-toxi-infections-alimentaires-collectives.-donnees-de-la-declaration-obligatoire-2019>

<sup>15</sup> Direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations.

principales espèces pathogènes (*C. botulinum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. tetani* et *C. perfringens*) à l'exception de *C. sordellii*, partagent un ancêtre commun et appartiennent au cluster I défini par Collins *et al.* (1994) et Prescott *et al.* (2016), et donc ne seraient pas impactées par la nouvelle classification.

*C. perfringens* se distingue par sa capacité à fermenter le glucose, le maltose, le lactose, et le saccharose, et à produire de la lécithinase et du sulfure d'hydrogène. *C. perfringens* est capable de survivre au stress induit par un potentiel redox élevé, allant de 250 mV à 350 mV, grâce aux complexes enzymatiques superoxyde dismutase et superoxyde réductase (Jean *et al.*, 2004).

Décrite pour la première fois en 1892 par Welch et Nuttall lors d'une autopsie humaine, cette bactérie est d'abord appelée *Bacillus aerogenes capsulatum*, puis *Clostridium welchii*, pour prendre définitivement le nom actuel de *Clostridium perfringens* au début du 20<sup>ème</sup> siècle (Lucey et Hutchins, 2004). L'espèce *C. perfringens* est représentée par des bacilles, non mobiles, capables de se développer à des pH compris entre 5,5 et 8,0 ainsi qu'à des températures comprises entre 20°C et 50°C, la température optimale de croissance étant de 37°C (Li et McClane, 2006). *C. perfringens* est une bactérie ubiquiste. Sa capacité à former des spores en conditions de stress lui permet de persister dans de nombreuses niches environnementales, notamment le sol, les eaux usées et les effluents d'élevage (De Jong *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2016). La bactérie est communément retrouvée dans le tractus intestinal de l'Homme et des animaux (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Revitt-Mills *et al.*, 2015; Theoret et McClane, 2016). Elle peut aussi être retrouvée dans les aliments et être à l'origine de TIAC (Li *et al.*, 2007b; Nowell *et al.*, 2010).

### **2.3.2. Principales toxines produites par *C. perfringens***

Les souches de *C. perfringens* peuvent produire de nombreuses toxines (17 connues à ce jour) et enzymes hydrolytiques (Bennett *et al.*, 2013; Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Petit *et al.*, 1999; Revitt-Mills *et al.*, 2015). L'espèce est subdivisée en sept toxinotypes, notés de A à G, déterminés selon les toxines produites (**Tableau 4**). Celles-ci se répartissent en quatre toxines majeures ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  et  $\iota$ ) et deux toxines mineures qui sont l'entérotoxine encore appelée CPE (*Clostridium perfringens* entérotoxine) et la toxine NetB. De plus, le gène mineur *cpb2*, non pris en compte dans la classification des toxinotypes, produit une toxine, appelée  $\beta_2$  qui, lorsqu'elle est présente, accentue les symptômes gastro-intestinaux.

Tableau 4: Toxinotypes de *C. perfringens* et gènes de virulence associés (Li *et al.*, 2013; Rood *et al.*, 2018; Uzal *et al.*, 2018, 2016).

Toxinotypes	Toxines produites					
	$\alpha$	$\beta^b$	$\epsilon$	$\iota$	CPE	NetB
A	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+		-	$\pm^d$	-
D	+	-	+	-	$\pm$	-
E	+	-	-	+	$\pm$	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+
gène de virulence	<i>cpa</i>	<i>cpb<sup>c</sup></i>	<i>etx</i>	<i>la/lb</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>
Localisation	chromosome	plasmide	plasmide	plasmide	chromosome / plasmide	plasmide

<sup>a</sup>(+) : présence ou (-) absence du gène de virulence ; <sup>b</sup> aussi dénommée  $\beta 1$  ; <sup>c</sup> aussi dénommé *cpb1* ; <sup>d</sup> gène *cpe* présent ou non

Chaque toxinotype est impliqué dans une maladie spécifique en santé humaine et animale (Tableau 5).

Tableau 5: Principales maladies humaines et animales associées aux toxinotypes de *C. perfringens* (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Petit *et al.*, 1999; Uzal *et al.*, 2016).

Toxinotypes (toxines)	Maladies chez l'Homme	Maladies chez l'animal	Animaux concernés
A ( $\alpha$ )	Gangrène gazeuse	Diarrhées Maladies gastro-intestinales Entérite nécrotique Gangrène gazeuse	Chien, porcs, chevaux, poulains, chèvres Volailles Moutons, agneaux, vaches, chevaux.
B ( $\alpha, \beta, \epsilon$ )	- <sup>a</sup>	Dysenterie Entérite hémorragique Entérotoxémies	Agneaux nouveau-nés Veaux, poulains nouveau-nés Ovins
C ( $\alpha, \beta, \pm$ CPE <sup>b</sup> )	Entérite nécrotique	Entérite nécrotique Entérotoxémies	Porcelets, agneaux, veaux, poulains ovins
D ( $\alpha, \epsilon, \pm$ CPE)	-	Entérotoxémies	Agneaux, moutons, veaux, chèvres
E ( $\alpha, \iota, \pm$ CPE)	-	Entérotoxémies	Veaux, lapins, bovins, moutons
F ( $\alpha, \text{CPE}$ )	Maladies gastro-intestinales (TIAC, diarrhées associées aux antibiotiques, diarrhée sporadique)	Entérite nécrotique	Volaille
G ( $\alpha, \text{NetB}$ )	-	Entérite nécrotique	Volaille

<sup>a</sup> maladie non répertoriée chez l'Homme ; <sup>b</sup> gène *cpe* présent ou non

La plupart des toxines de *C. perfringens* agissent sur la membrane cellulaire par la formation de pores, l'association à des protéines membranaires, la modification de la perméabilité et la perturbation du cytosquelette d'actine (Figure 14). Les toxines  $\theta$  et  $\sigma$  représentées sur la Figure 14,

sont des toxines mineures formant des pores ne jouant pas un rôle dans la détermination du toxinotype de *C. perfringens*. Elles ne seront pas détaillées dans les paragraphes suivants.

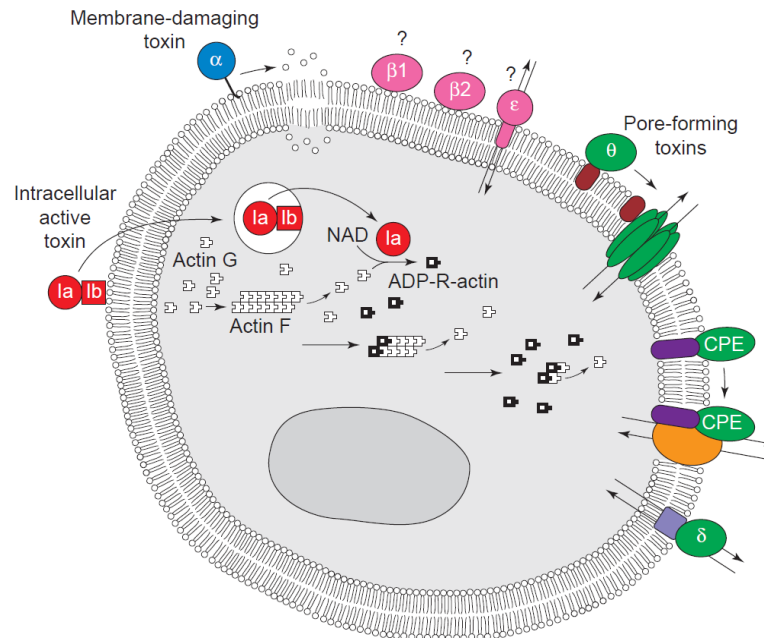


Figure 14: Représentation schématique des cibles et modes d'action des toxines de *C. perfringens*. La toxine  $\alpha$  (bleu foncé) endommage la membrane. Les toxines formant des pores (vertes) reconnaissent des récepteurs membranaires spécifiques : cholestérol (brun) pour la toxine  $\theta$  (PfoA), ganglioside GM2 (mauve) pour la toxine  $\delta$  et un récepteur protéique (violet) pour l'entérotoxine (CPE), qui s'associe à une autre protéine membranaire (orange) pour former un grand complexe. La toxine  $\beta 1$  et la toxine  $\beta 2$  (rose) joueraient un rôle au niveau de la membrane. La toxine  $\epsilon$  (rose) forme un grand complexe avec une protéine membranaire et modifie la perméabilité membranaire. La toxine  $\iota$  est constituée de deux protéines (rouge), et agit de manière intracellulaire (Petit *et al.*, 1999).

### 2.3.2.1. La toxine $\alpha$

La toxine  $\alpha$  est codée par le gène *cpa* (Tableau 4), localisé sur le chromosome. Le gène *cpa* est situé près de l'origine de réplication *OriC* qui est l'une des régions les plus conservées du chromosome de *C. perfringens* (Uzal *et al.*, 2010), suggérant le rôle essentiel de ce gène. En raison de sa présence systématique chez tous les toxinotypes de *C. perfringens*, le gène *cpa* est utilisé comme un marqueur moléculaire spécifique de l'espèce. Lorsque le gène *cpa* est le seul gène de virulence présent dans la bactérie, celle-ci est de type A. Les souches de type A sont responsables de gangrène gazeuse chez l'Homme et l'animal ainsi que d'entérite nécrotique chez la volaille (Tableau 5) (Fohler *et al.*, 2016a; Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Petit *et al.*, 1999; Uzal *et al.*, 2016). La toxine  $\alpha$  est une métallo-enzyme, associée au zinc, possédant une activité phospholipase C, une activité sphingomyélinase et une activité lécithinase (Petit *et al.*, 1999). Elle hydrolyse les phospholipides de la membrane de plusieurs types cellulaires, dont les érythrocytes, les cellules endothéliales et les

cellules musculaires (Goossens *et al.*, 2017), perturbant ainsi la fonction des membranes, conduisant à la lyse cellulaire et à la nécrose tissulaire (**Figure 14**) (Li *et al.*, 2013; Sakurai, 2004; Titball *et al.*, 1999). La protéine est composée de 370 acides aminés et possède un poids moléculaire de 40 kDa (Goossens *et al.*, 2017). Elle est composée de deux domaines biologiquement actifs : un domaine hélicoïdal N-terminal qui comprend le site actif de l'enzyme et un domaine C-terminal qui est essentiel à l'activité cytolytique et toxique (Naylor *et al.*, 1998; Oda *et al.*, 2015). Le domaine C-terminal de la toxine  $\alpha$  présente une similarité structurelle avec les domaines de liaison lipidique des protéines eucaryotes telles que la synaptotagmine et la lipase pancréatique. Les produits liposolubles de ces réactions tels que le diacylglycérol et la céramide sont importants dans les voies de signalisation des cellules hôtes. Par conséquent, la rupture directe de la membrane de la cellule hôte n'est pas uniquement due à la toxine  $\alpha$ . Il a également été montré que cette toxine active la voie MEK / kinase (ou MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase) régulée par le signal extracellulaire ERK (Extracellular-signal-Regulated Kinase) (Monturiol-Gross *et al.*, 2012; Sakurai, 2004; Titball *et al.*, 1999). L'activation de cette voie induit un stress oxydatif dans les cellules affectées, conduisant à une accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène toxique pour la cellule. Cette accumulation conduit à l'apoptose de la cellule cible.

#### 2.3.2.2. La toxine $\beta$ 1

La toxine  $\beta$ 1, aussi appelée toxine  $\beta$ , est codée par le gène *cpb1*, localisé sur de grands plasmides dont la taille varie de 65 à 110 kb (Freedman *et al.*, 2015; Gurjar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Theoret and McClane, 2016), possédant tous les gènes *tcp* (Transfer of *Clostridial* plasmids) (Cf. § 2.3.3). Ce sont des plasmides conjugatifs qui peuvent se transférer *via* la conjugaison bactérienne entre deux souches de *C. perfringens*. La toxine  $\beta$ 1 fait partie des toxines  $\beta$ -PFTs (Toxine formant des pores), riches en feuillet  $\beta$  et contenant peu de résidus hydrophobes dans leur structure primaire (Parker et Feil, 2005). La toxine  $\beta$ 1 est sécrétée sous la forme de protéine monomérique d'un poids moléculaire de 35 kDa (Autheman *et al.*, 2013). Elle cible les membranes des cellules hôtes et provoquent leur lyse (**Figure 14**) (Parker et Feil, 2005).

La toxine  $\beta$ 1 est produite par les cellules végétatives de type B et C (**Tableau 4**) (Cavalcanti *et al.*, 2004). Les pathologies associées à cette toxine se caractérisent par une hémorragie et une nécrose de la muqueuse intestinale (Diab, 2016) (**Tableau 5**). En effet, la toxine crée des pores sélectifs pour les cations monovalents dans les membranes cellulaires et provoque l'efflux des ions potassium et sodium, ce qui conduit en un dérèglement de l'équilibre électrolyte normal (Freedman *et al.*, 2015) entraînant la mort rapide des cellules par nécrose (Autheman *et al.*, 2013).

### 2.3.2.3. La toxine $\beta 2$

La toxine  $\beta 2$ , codée par le gène *cpb2* a longtemps été confondue avec la toxine  $\beta 1$ . Elle est considérée comme une toxine mineure, sa présence au sein du génome bactérien ne permettant pas de déterminer un toxinotype particulier. Cette toxine a été purifiée et identifiée à partir d'une souche de *C. perfringens* isolée d'un porc atteint d'entérite hémorragique néonatale (Gibert *et al.*, 1997). Le gène *cpb2* est localisé sur des plasmides de différentes tailles allant de 48 à 110 kb (Li *et al.*, 2013). La protéine produite a un poids moléculaire de 28 kDa dont la séquence en acides aminés ne présente que 15% de similarité avec celle de la toxine  $\beta 1$  (Theoret et McClane, 2016). Initialement, le gène *cpb2* a été identifié dans les isolats appartenant au type C (Diab, 2016; Gurjar *et al.*, 2010) mais il est également présent chez tous les toxinotypes de *C. perfringens* (Jost *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2003). Deux allèles principaux (consensus et atypique) du gène *cpb2* ont été décrits van Asten *et al.*, (2010). L'allèle *cpb2* consensus est présent principalement dans les isolats de *C. perfringens* d'origine porcine (Jost *et al.*, 2006; Popoff and Bouvet, 2013) alors que l'allèle atypique prédomine dans les isolats d'origine non porcine (Gibert *et al.*, 1997).

Le mode d'action de la toxine  $\beta 2$  est mal défini à ce jour, mais celle-ci aurait des effets similaires à ceux de la toxine  $\beta 1$  (Li *et al.*, 2013). Cependant, le gène *cpb2* a aussi été détecté dans les isolats du microbiote intestinal d'animaux sains (Freedman *et al.*, 2015), ce qui complique la compréhension du rôle de cette toxine.

### 2.3.2.4. La toxine $\epsilon$

Les toxinotypes B et D sont les seuls porteurs du gène *etx* codant pour la toxine  $\epsilon$ . Ce gène est localisé sur un plasmide conjugatif. La majorité des souches ne contiennent que le gène *etx*, outre le gène *cpa* commun à tous les *C. perfringens*, mais certaines souches hébergent également le gène *cpb2* codant la toxine mineure  $\beta 2$  et / ou le gène *cpe* codant l'entérotoxine. Les plasmides contenant le gène *etx* se caractérisent par une diversité importante de taille (48 à 110 kb). À titre d'exemple, un isolat de *C. perfringens* de type D peut posséder (i) un plasmide de 48 kb portant seulement le gène *etx*, (ii) un plasmide de 75 à 110 kb portant trois gènes (*etx*, *cpb2* et *cpe*) ou (iii) trois plasmides distincts (de taille comprise entre 75 et 110 kb) portant séparément les gènes *etx*, *cpe* et *cpb2* (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Sayeed *et al.*, 2007).

La toxine  $\epsilon$  est produite en phase exponentielle de croissance et libérée d'abord sous forme de protoxine de 296 acides aminés peu active ayant un poids moléculaire de 32 kDa (**Figure 14**), qui est transformée par la suite en protéine active, 1 000 fois plus toxique que la protoxine (Uzal *et al.*, 2014). L'activation est réalisée par des protéases intestinales produites par l'hôte, comme la trypsine, la chymotrypsine et une métallo-protéase, appelée  $\lambda$ -toxine, produite par certaines souches de *C. perfringens* (Harkness *et al.*, 2012). Les protéases clivent 13 acides aminés de l'extrémité N-terminale

et 29 acides aminés de l'extrémité C-terminale. L'élimination de ces acides aminés permet l'activation de la toxine (Robertson *et al.*, 2011). L'action de la toxine  $\epsilon$  commence par la liaison à son récepteur cellulaire, l'oligomérisation et la formation d'un pré-pore heptamérique (Popoff, 2011). Après oligomérisation, le domaine formant le pore s'insère dans la membrane cellulaire de l'hôte, provoquant une fuite des ions potassium intracellulaires, une augmentation des ions chlorure et sodium avec un afflux d'ions calcium (Stiles *et al.*, 2013).

La toxine  $\epsilon$  est responsable d'entérotoxémies chez les moutons et les chèvres. Elle affecte les jonctions serrées endothéliales du cerveau, provoquant un gonflement entraînant une augmentation de la pression intracrânienne suivie d'une nécrose (**Tableau 5**) (Finnie, 1984; Morris *et al.*, 2017; Wioland *et al.*, 2013). Il a été démontré que la toxine  $\epsilon$  était capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'exercer une activité cytotoxique (Dorca-Arévalo *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2017). La toxine  $\epsilon$  diffère fortement des autres toxines formant des pores produites par *C. perfringens*, car cette toxine appartient à la famille des aérolysines qui se classe parmi les toxines les plus puissantes produites par les *Clostridium* après les toxines botulique et tétanique, en raison de la faible dose létale (70 ng/kg) et de sa spécificité pour les cellules neuronales (Bokori-Brown *et al.*, 2011).

#### 2.3.2.5. La toxine $\iota$

La toxine  $\iota$  est spécifique des souches de *C. perfringens* de type E (**Tableau 4**) (Freedman *et al.*, 2015). Il s'agit d'une toxine binaire, composée de deux sous-unités (iota a (Ia) et iota b (Ib)) essentielles au fonctionnement de la toxine et de sa toxicité (Sakurai *et al.*, 2009). Le gène *iap* code la sous-unité enzymatique. Le gène *ibp* code Ib qui correspond à une protéine de liaison permettant l'endocytose de la sous-unité enzymatique Ia dans la cellule cible (Morris and Fernández-Miyakawa, 2009). Les deux gènes sont séparés de 40 pb et forment un opéron. La transcription est réalisée *via* un promoteur unique, situé en amont du gène *iap* (Sakurai *et al.*, 2009). L'opéron est principalement retrouvé sur deux types de plasmides : un plasmide de 65 kb appelé pCPPB-1 (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Miyamoto *et al.*, 2011) ou un plasmide de plus grande taille (97 à 135 kb) ayant un squelette proche de celui du plasmide pCPF5603 retrouvé chez les souches de *C. perfringens* de type F. Ce plasmide porte l'opéron *iap* et *ibp* ainsi que la copie du gène *cpe* non fonctionnel (Billington *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013, 2007a).

Les souches de *C. perfringens* de type E sont associées à des entérites nécro-hémorragiques, essentiellement chez les veaux et les agneaux (**Tableau 5**) (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Petit *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 2009), en raison de l'effet entérot toxique, dermonécrotique et léthal de la toxine (Barth and Stiles, 2008; Stiles *et al.*, 2011).



La composante Ia est une NAD<sup>+</sup> glycohydrolase et une ADP ribosyl-transférase (Sakurai *et al.*, 2009). Elle provoque une ADP-ribosylation de l'actine des cellules conduisant à une dépolymérisation de celle-ci. Cela entraîne une désorganisation des filaments d'actine, et par conséquent, une perte de la forme de la cellule (Barth and Stiles, 2008; Morris and Fernández-Miyakawa, 2009). La composante Ib se lie aux cellules et forme un pore heptamérique (Miyamoto *et al.*, 2011) qui est nécessaire à la pénétration de la sous-unité Ia dans la cellule. Cela conduit également à l'efflux des ions potassium et l'influx des ions sodium.

### 2.3.2.6. L'entérotoxine ou CPE (*C. perfringens* entérotoxine)

L'entérotoxine est codée par le gène *cpe*, et contrairement aux autres toxines, celle-ci est produite lors de la sporulation (Freedman *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2016). La régulation du gène *cpe* est réalisée via la protéine Spo0A qui est un facteur de transcription de la sporulation chez *C. perfringens*. Le gène *spo0A* est activé via le quorum sensing (Agr-like QS system) lors d'un changement environnemental défavorable à la bactérie. La protéine SpoA va alors activer d'autres facteurs de transcription, appelés facteurs de transcription alternatifs tels que SigF qui va à son tour activer d'autres facteurs de transcription par cascade d'activation. Les facteurs alternatifs SigE et SigF vont alors se fixer sur différents promoteurs (P1, P2 et/ou P3) permettant la production de la toxine CPE (Figure 15) (Freedman *et al.*, 2016).

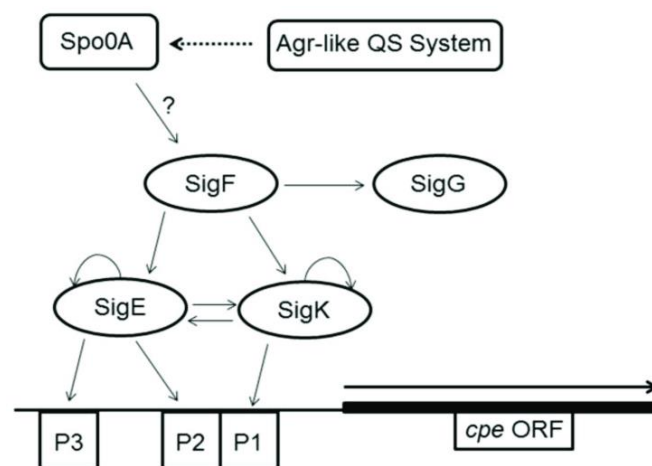
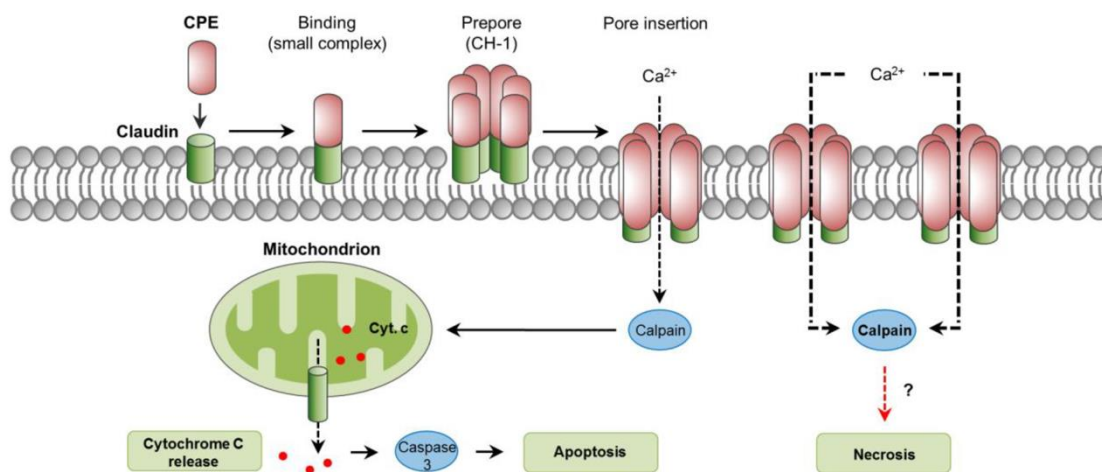


Figure 15: Régulation du gène *cpe* lors de la sporulation de *C. perfringens*. Cette régulation est également applicable à l'ensemble des gènes nécessaires à la sporulation (Freedman *et al.* 2016).

Lors de sa production, l'entérotoxine s'accumule dans le sporange et est libérée au cours de la lyse de la cellule végétative libérant la spore (Freedman *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2007, 2004; Li *et al.*, 2016). L'entérotoxine est une aérolysine. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique contenant 319 acides aminés (Freedman *et al.*, 2016). Le domaine C-terminal intervient dans la

liaison de l'entérotoxine à son récepteur cellulaire, les claudines, qui sont des protéines importantes des jonctions serrées (protéines de 20 à 25 kDa composées de quatre domaines transmembranaires et de deux boucles extracellulaires) (Shrestha et McClane, 2013; Veshnyakova *et al.*, 2010). Navarro *et al.* (2018) qui ont décrit son mécanisme d'action (**Figure 17**), ont montré que plusieurs complexes se forment pour créer un large complexe moléculaire de 450 kDa appelé CH-1 (contenant 6 molécules de la toxine CPE) (Freedman *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2013). Le complexe s'insère dans les membranes formant un pore sélectif pour les cations. L'influx d'ions calcium dans les cellules intestinales active la calpaïne, protéine déclenchant une apoptose ou une nécrose des cellules selon la quantité faible ou élevée de toxines produites (Deguchi *et al.*, 2009; Freedman *et al.*, 2016, 2015; Li *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2018; Veshnyakova *et al.*, 2010). Cette mort cellulaire libère un important volume de liquide qui s'accumule dans les intestins, conduisant à des diarrhées (Deguchi *et al.*, 2009; Freedman *et al.*, 2016, 2015; Li *et al.*, 2013). Un contact prolongé avec la toxine peut entraîner une entérotoxémie (absorption de la toxine dans le sang) qui peut affecter le foie et les reins et causer le décès de l'hôte.



**Figure 16: Mécanisme d'action de l'entérotoxine.** La liaison initiale de la toxine CPE aux récepteurs claudines entraîne la formation d'un petit complexe. L'interaction de six petits complexes conduit à une oligomérisation de l'entérotoxine et la formation d'un pré-pore puis d'un pore sur la membrane plasmique. Il se produit un flux de d'ions calcium qui stimule l'activité des calpaines, entraînant l'activation de la caspase-3 et l'apoptose cellulaire (Navarro *et al.*, 2018).

L'entérotoxine est produite principalement par les *C. perfringens* de type F (**Tableau 4**) (Rood *et al.*, 2018) anciennement appelé "*C. perfringens* de type A producteur d'entérotoxine". Cependant, des souches appartenant aux toxinotypes C et D, peuvent également produire l'entérotoxine lorsque le gène *cpe* est présent sur un de leurs plasmides de virulence (Billington *et al.*, 1998). Dans d'autres cas, des isolats de *C. perfringens* de type E possédaient une copie du gène *cpe* sur leurs plasmides mais celui-ci est dit « silencieux » car suite à une mutation, la transcription de ce gène muté produit une protéine tronquée non fonctionnelle (Miyamoto *et al.*, 2011).

Les souches de *C. perfringens* majoritairement incriminées dans les TIAC sont du toxinotype F (Baums *et al.*, 2004; Lindström *et al.*, 2011; Wijnands *et al.*, 2011). Le portage du gène *cpe* codant l'entérotoxine est essentiellement chromosomique (70% des souches) mais il peut être plasmidique (Freedman *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2013). La localisation du gène (chromosome ou plasmide) semble associée à des groupes phylogénétiques distincts (Xiao *et al.*, 2012). Le gène *cpe* situé sur le chromosome est bordé de deux séquences d'insertion (IS) suggérant la présence d'un transposon, élément génétique mobile permettant le passage du gène *cpe* d'un plasmide au chromosome bactérien et inversement. Toutefois, cette hypothèse, émise par différents auteurs (Brynstad *et al.*, 1997; Freedman *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2013), n'a pas été vérifiée.

Le portage plasmidique du gène *cpe* est associé à deux plasmides distincts : le plasmide pCPF4969 et le plasmide pCPF5603. Les deux plasmides de 70,5 kb et de 75,3 kb, respectivement, portent une copie du gène *cpe*. Le gène *cpe* du plasmide pCPF4969 est bordé de deux IS (*IS1469* en amont et l'*IS1470-like* en aval) (Freedman *et al.*, 2016, 2015; Li *et al.*, 2013) et il ne porte aucun autre gène codant des toxines majeures ou mineures. Le gène *cpe* du plasmide pCPF5603, également bordé par deux IS (*IS1469* en amont et l'*IS1151* en aval), porte également le gène *cpb2* codant la toxine mineure  $\beta 2$  (Freedman *et al.*, 2016, 2015; Li *et al.*, 2013).

Parmi les souches de *C. perfringens* isolées de différentes matrices (aliments, sols, fèces humaines ou animales), la prévalence des souches de type F est de 0,8% à 15,6% (Fohler *et al.*, 2016b; Gurjar *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007b; Nagpal *et al.*, 2015; Wijnands *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2012). La caractérisation, par PCR multiplex, de 72 isolats de *C. perfringens* collectés dans des aliments a montré que 8 d'entre-eux (11%) possédaient le gène de l'entérotoxine (Xiao *et al.*, 2012). Dans une autre étude, Wijnands *et al.* (2011) ont caractérisé des isolats de *C. perfringens* issus d'aliments incriminés dans des TIAC ou provenant d'échantillons de surveillance de différentes productions alimentaires. La totalité des 135 isolats identifiés comme étant des *C. perfringens* appartenait au toxinotype A, selon l'ancienne classification. Parmi ces isolats, 21 portaient le gène de l'entérotoxine (15,6%). Li *et al.* (2007) ont rapporté la prévalence de *C. perfringens* sur les surfaces de cuisines (plans de travail, micro-ondes, réfrigérateurs...) et dans des sols prélevés dans des villes, des banlieues et des fermes. Aucun *C. perfringens* n'a été isolé sur des surfaces de cuisines. En revanche, sur les 502 échantillons de sols, 343 souches de *C. perfringens* (formes végétatives présumées) ont été isolées. Onze d'entre-elles (2,2%) possédaient le gène *cpe*. Dans un second temps, les 502 échantillons ont été soumis à un choc thermique (80°C pendant 20 minutes) afin de sélectionner les formes sporulées. Dans ces conditions, 377 colonies de *C. perfringens* ont été isolées et 25 d'entre-elles (6,6%) portaient le gène *cpe*. Gurjar *et al.* (2008) ont isolé 241 souches de *C. perfringens* de

fèces bovines qu'ils ont caractérisées par PCR multiplex en temps réel. Parmi les souches isolées, 10 (4,1%) étaient porteuses du gène de l'entérotoxine. Fohler *et al.* (2016) ont isolé 660 souches de *C. perfringens* à partir de fèces bovines, de rumen et d'aliments. Leur caractérisation par PCR multiplex a mis en évidence 5 souches porteuses du gène de l'entérotoxine (0,8%). L'étude menée par Nagpal *et al.* (2015) sur des fèces humaines (fèces de 124 enfants et 221 adultes) a montré une prévalence du gène *cpe* de 10% chez les enfants et de 1% chez les adultes.

Il ressort de ces études que les *C. perfringens* porteurs du gène *cpe* ont une prévalence relativement faible mais sont retrouvés dans des environnements variés incluant les fèces d'animaux d'élevage et le sol.

#### 2.3.2.7. Necrotic Enteritis Toxin B-Like (NetB)

Selon la nouvelle classification de *C. perfringens*, la toxine NetB est produite uniquement par les souches de type G (Rood *et al.*, 2018; Uzal *et al.*, 2018) (**Tableau 4**). Cette toxine est retrouvée dans les cas d'entérites nécrotiques chez la volaille (**Tableau 5**) (Keyburn *et al.*, 2008). La toxine NetB est une protéine de 323 acides aminés (Gurjar *et al.*, 2010). Après le clivage d'une séquence signal, une protéine mature d'un poids moléculaire de 33 kDa est obtenue. La toxine NetB partage 38% d'homologie avec la toxine  $\beta$ 1 de *C. perfringens* et 30% avec les toxines  $\alpha$ -hémolysine de *Staphylococcus aureus* et CytK de *Bacillus cereus* (Bannam *et al.*, 2006). Comme les autres toxines formant des pores, la toxine NetB est produite sous forme monomérique, s'oligomérisse à la surface de la membrane de l'hôte, et s'insère dans la membrane pour former des pores de 1,6 à 1,8 nm de diamètre (Savva *et al.*, 2013). La formation de pores entraîne l'efflux des ions potassium et l'influx des ions sodium, calcium et chlorure, conduisant à la lyse osmotique de la cellule (Bannam *et al.*, 2006; Keyburn *et al.*, 2008).

### 2.3.3. Résistance aux antibiotiques

#### 2.3.3.1. Le transfert horizontal chez *C. perfringens*

Les plasmides présents chez *C. perfringens* possèdent un locus de 11 gènes appelé locus *tcp* (Transfer of *Clostridial* plasmids) (**Figure 17**), apparenté à celui des transposons conjugatifs Tn916. Ces plasmides sont dits conjugatifs car ils sont capables de se transférer "seul" grâce à la présence de ce locus *tcp*.

La conjugaison chez les *C. perfringens* est réalisée par un système de sécrétion de type IV (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Bhatta *et al.*, 2013; Chandran *et al.*, 2009; Goessweiner-Mohr *et al.*, 2013).

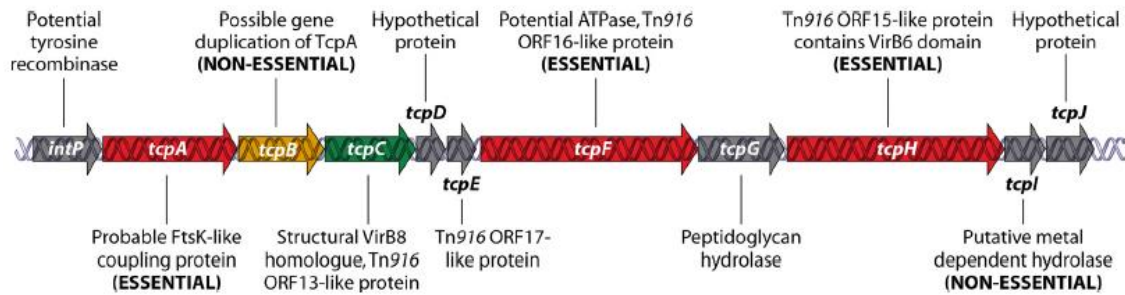


Figure 17 Représentation du locus *tcp* (Li *et al* 2013).

Ces plasmides se caractérisent par l'absence d'un gène codant une relaxase qui est une protéine essentielle au bon déroulement de la conjugaison. Dans le cas du locus *tcp*, le gène *intP* est essentiel à la conjugaison (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Steen *et al.*, 2009). Ce gène code une tyrosine kinase dont le rôle semble similaire à celui d'une relaxase. La protéine TcpA est une protéine de couplage qui ancre le complexe relaxosome-ADN simple brin au pont de conjugaison. Cette protéine est constituée de deux domaines transmembranaires N-terminaux et d'un domaine cytoplasmique qui comprend un domaine ATPase de type FtsK trouvé dans les protéines de la superfamille des ADN translocase. TcpA forme des homodimères et interagit avec TcpC, TcpG et TcpH (Bantwal *et al.*, 2012; Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Porter *et al.*, 2012; Steen *et al.*, 2009).

Le gène *tcpC* code la protéine TcpC qui est indispensable au transfert conjugatif. Elle possède un domaine transmembranaire N-terminal qui permet sa localisation au niveau de l'enveloppe et des interactions protéine-protéine. Elle permet l'assemblage et la stabilisation de la machinerie de transfert (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Porter *et al.*, 2012).

Les protéines TcpD et TcpE codées par les gènes *tcpD*, *tcpE* sont de petites protéines transmembranaires de 115 et 122 acides aminés dont le rôle dans le transfert est inconnu (Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013). Les gènes *tcpF* et *tcpH* sont essentiels lors du transfert du plasmide dans la cellule receveuse. La protéine TcpF contient un domaine ATPase dont le rôle est de fournir à la bactérie l'énergie nécessaire au transfert d'ADN plasmidique. TcpF et TcpH sont localisés aux pôles cellulaires. TcpH se localise essentiellement dans la membrane. La protéine TcpH est la principale protéine structurale du pont de conjugaison. Cette protéine structurale permet la construction d'un canal transmembranaire à travers lequel l'ADN simple brin plasmidique passe de la cellule donneuse à la cellule receveuse (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; Bhatti *et al.*, 2013; Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Teng *et al.*, 2008). Les gènes *tcpG* et *tcpI* codent des peptidoglycanes hydrolases. Ces protéines hydrolysent la paroi afin que le système de sécrétion puisse entrer en contact avec la cellule receveuse (Bantwal *et al.*, 2012; Chandran *et al.*, 2009).

Soge *et al.* (2009) ont réalisé des expériences de conjugaison entre des souches de *C. perfringens* et une souche d'entérocoques. Huit souches de *C. perfringens* ont été utilisées comme donneuses de GRA. Les souches de *C. perfringens* portaient des gènes de résistance aux macrolides (*mef(A)*, *ermB*, et/ou *ermQ*) et des gènes de résistance aux tétracyclines (*tetA(P)* et/ou *tetB(P)* et/ou *tet(M)*). La souche receveuse était *Enterococcus faecalis* JH2-2. La mise en évidence de la conjugaison a été réalisée par un ensemencement de la souche donneuse et de *E. faecalis* sur un milieu gélosé (milieu BHI). Alors qu'aucun transfert des gènes *tetA(P)* et *tetB(P)* n'a été observé, la fréquence de transfert des gènes *ermB*, *ermQ* et *mef(A)* vers *E. faecalis* était comprise entre  $10^{-7}$  et  $10^{-9}$  par souche receveuse et celle du gène *tet(M)* était de  $10^{-9}$  par souche receveuse. À notre connaissance, cette étude a été la seule à mettre en évidence que des souches de *C. perfringens* peuvent transférer par conjugaison, en conditions contrôlées, le gène *tet(M)* et des gènes de résistance aux macrolides. Ces données suggèrent que des souches de *C. perfringens* résistantes aux antibiotiques à l'instar des *Clostridium* non pathogènes, sont capables d'agir comme un réservoir de GRA et peuvent contribuer à la dissémination de GRA chez les bactéries autochtones (Adams *et al.*, 2018; Hamza *et al.*, 2018; Leclercq *et al.*, 2016; Soge *et al.*, 2009).

#### 2.3.3.2. Les gènes de résistance chez *C. perfringens*

La résistance la plus étudiée chez *C. perfringens* est celle associée à la tétracycline. Ainsi, le plasmide pCW3 porteur de la protéine Tet(P), constitué de deux gènes de résistance à la tétracycline (*tetA(P)* et *tetB(P)*), est largement retrouvé chez cette espèce (Bannam *et al.*, 2006; Kather *et al.*, 2006). La résistance *tet(P)* est répandue parmi les souches conjugatives et non-conjugatives de *C. perfringens* résistantes à la tétracycline (Johanesen *et al.*, 2001a, 2001b). Les séquences des gènes *tetA(P)* et *tetB(P)* se chevauchent sur 17 nucléotides. Le premier gène *tetA(P)* code une protéine de 46 kDa impliquée dans l'efflux actif de la tétracycline et le second gène *tetB(P)* code une protéine de protection ribosomale de 72,6 kDa. Les gènes *tetA(P)* et *tetB(P)* sont inductibles en présence de tétracycline. Ils forment un opéron qui est transcrit à partir du promoteur P3, situé à 529 pb en amont du codon start du gène *tetA(P)*. Des expériences de mutations sur cette séquence du promoteur P3 ont conduit à une diminution significative de la transcription de l'opéron *tet(P)* (Johanesen *et al.*, 2001a). En aval du promoteur P3, un terminateur appelé T1 est un élément de contrôle intrinsèque de l'opéron *tet(P)*. En effet, la délétion ou la mutation sur la séquence de ce terminateur induit une surexpression de la transcription des gènes *tetA(P)* et *tetB(P)*, délétère pour la bactérie (Johanesen *et al.*, 2001a).

Johansson *et al.* (2004) ont étudié la sensibilité de 102 isolats de *C. perfringens* issus d'élevages de volailles, en Suède, en Norvège et au Danemark. Ils ont testé 10 antibiotiques en utilisant la

méthode des microdilutions. Tous les isolats, indépendamment de leur origine, étaient sensibles à l'ampicilline, à la narasine, à l'avilamycine, à l'érythromycine et à la vancomycine. Quelques isolats présentaient une faible résistance à la virginiamycine et à la bacitracine. Le pourcentage d'isolats résistants à la tétracycline différait selon les pays. Il était de 10% au Danemark, de 29% en Norvège et de 76% en Suède. De plus, 80% des isolats résistants portaient les gènes *tetA(P)* et *tetB(P)* et 20% portaient uniquement le gène *tetA(P)*, suggérant que les isolats résistants à la tétracycline portaient *a minima* le gène *tetA(P)* (Johansson *et al.*, 2004). Dans une étude menée aux Etats-Unis, Soge *et al.* (2009) ont recherché trois gènes de résistance à la tétracycline (*tetA(P)*, *tetB(P)*, *tet(M)*) et trois gènes de résistance aux macrolides (*ermB*, *ermQ*, *mef(A)*) sur 160 isolats de *C. perfringens* provenant d'échantillons d'eau, de sols et d'eaux usées. Sur l'ensemble des isolats, 67,4% portaient un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques. Les gènes de résistance les plus fréquemment retrouvés parmi les isolats étaient les gènes *tetA(P)* (53% des isolats), *ermB* (26%), *tetB(P)* (22%) et *mef(A)* (18%). Les gènes *tet(M)* et *ermQ* n'ont été mis en évidence que dans 8% et 1% des isolats, respectivement.

### 3. Antibiorésistance dans les effluents d'élevage

De nombreux antibiotiques utilisés chez les animaux d'élevage sont mal absorbés dans l'intestin, entraînant leur excrétion dans les fèces sous forme de métabolites actifs. De plus, les déjections des animaux traités aux antibiotiques, mais aussi, en quantité moindre, celles des animaux non traités, contiennent des bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) ainsi que des gènes de résistance aux antibiotiques (GRA). Ces derniers sont portés par des éléments génétiques mobiles ou sous forme d'ADN extracellulaire disponibles pour la transformation bactérienne (Zhang *et al.*, 2013). L'épandage des effluents d'élevage constitue donc un vecteur de contamination des sols par les antibiotiques et les BRA, conduisant à un risque de contamination des productions végétales, de la faune sauvage, des animaux en pâture ou, lors d'épisodes pluvieux, de contamination des eaux de surface ou souterraines (Amador *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2020; Oliver *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2018; van Overbeek *et al.*, 2014).

Les GRA les plus recherchés dans les effluents d'élevage sont les gènes *tet* (tétracyclines), *bla* (pénicillines), *sul* (sulfamides), *erm* (macrolides) et dans une moindre mesure les gènes *qnr* et *mcr* (fluoroquilonone et colistine). L'abondance et la diversité des GRA dans les effluents dépendent de l'espèce animale et du type d'effluent ainsi que de la zone géographique (He *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2019; Marti *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2018; L. Zhang *et al.*, 2019). He *et al.* (2020) ont montré que les teneurs en GRA (*tet*, *sul*, *erm* et *bla*) varient considérablement selon l'origine animale (porcins, bovins, et volailles) mais également, pour un même animal, entre les types d'effluents (lisiers ou

fumiers) (Figure 18). À titre d'exemple, les concentrations en gènes *tet* dans des lisiers porcins sont comprises entre  $10^4$  et  $10^{11}$  copies/g de poids humide (Han *et al.*, 2018; Joy *et al.*, 2013).

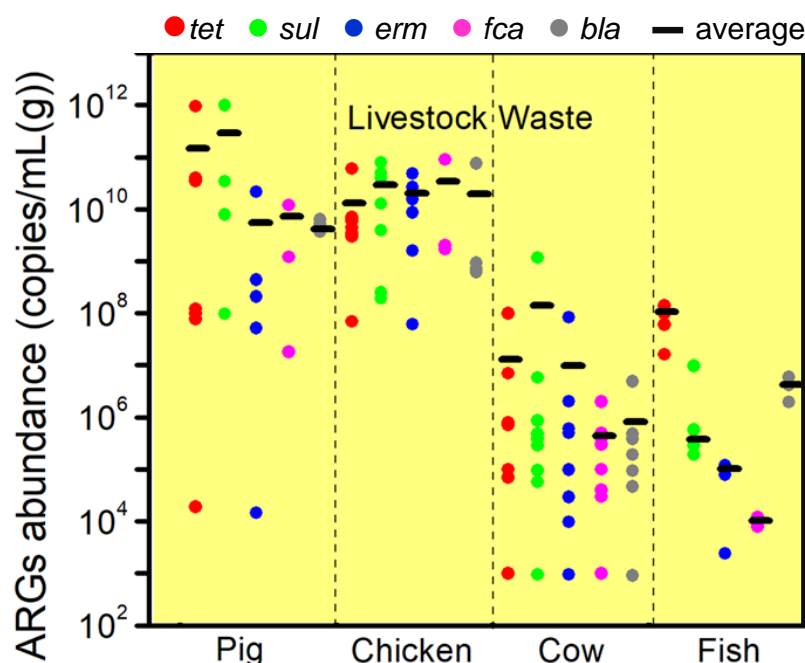


Figure 18: Abondances de différents GRA (copies/ml ou g) dans les effluents d'élevage. Rouge : gènes *tet* (tétracyclines) ; vert : gènes *sul* (sulfamides) ; bleu : gène *erm* (macrolides) ; rose ; gène *fca* (florenicol, chloramphénicol et amphénicol) ; gris : gènes *bla* (pénicillines) ; trait noir : moyenne. (He *et al.*, 2020).

Les modes d'administration des antibiotiques aux animaux (Gros *et al.*, 2019; Van Boeckel *et al.*, 2015), leur exposition aux métaux lourds (Baker-Austin *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2012), l'âge des animaux, la durée de stockage des effluents (Joy *et al.*, 2014) et la teneur en azote (sous forme  $\text{NH}_4^+$ ) des effluents peuvent également contribuer à la variabilité de la teneur en GRA.

### 3.1. Gènes de résistance aux tétracyclines

Il existe plusieurs gènes de résistance aux tétracyclines (34 gènes *tet*, 3 gènes *otr*, un gène *tcr*), situés sur des plasmides ou sur le chromosome, qui agissent par 3 mécanismes : efflux, protection ribosomale ou modification chimique de la cible (Roberts, 2005). Les gènes *tet* sont présents dans les effluents d'élevage (Guo *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2020) mais à des concentrations variables. Zou *et al.* (2020) ont rapporté des concentrations en gènes *tet(A)*, *tet(O)* et *tet(X)* dans des effluents porcins de  $2 \cdot 10^{10}$ ,  $1 \cdot 10^{12}$  et  $1 \cdot 10^{10}$  copies/g de poids sec, respectivement. Dans les effluents bovins, les concentrations en gènes *tet* varient de  $2 \cdot 10^8$  (Wallace *et al.*, 2018) à  $5 \cdot 10^{11}$  copies/g de poids humide (Han *et al.*, 2018). Sun *et al.* (2016) ont



observé des concentrations en gènes *tet(C)*, *tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(W)* et *tet(X)* de  $3 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^7$ ,  $2 \cdot 10^8$ ,  $5 \cdot 10^9$  et  $5 \cdot 10^9$  copies/g de poids sec de lisier bovin, respectivement. Dans les fumiers de volailles, les concentrations en gènes *tet* sont comprises entre  $5 \cdot 10^7$  et  $1,2 \cdot 10^{11}$  copies/g de poids humide (Han *et al.*, 2018).

### 3.2. Gènes de résistance aux sulfamides

Les trois gènes *sul* identifiés (Antunes *et al.*, 2005; Ben *et al.*, 2017) agissent sur la synthèse de l'acide folique (Ben *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2010). Ils sont présents chez de nombreuses espèces bactériennes car ils sont souvent situés sur des EGM portés par des plasmides à large spectre conjugatifs et mobilisables (Heuer *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2014) tels que les intégrons de classe 1 et les transposons (Byrne-Bailey *et al.*, 2009; He *et al.*, 2014; Heuer *et al.*, 2011b; Perreten and Boerlin, 2003; Wang *et al.*, 2014). La présence de gènes *sul* dans les effluents d'élevage porcin et bovin a été associée à l'utilisation de sulfamides (Heuer *et al.*, 2011a; McKinney *et al.*, 2010).

Zou *et al.* (2020) ont rapporté des concentrations en gènes *sul1* et *sul2* dans le lisier de porc de  $8 \cdot 10^{11}$  et  $4 \cdot 10^{10}$  copies/ g de poids sec, respectivement. Des concentrations plus faibles ont été observées dans les effluents bovins. Tien *et al.* (2017) ont rapporté des concentrations en gène *sul1* dans du lisier bovin de  $6,1 \cdot 10^9$  copies / g de poids sec. D'autres études ont montré que les concentrations en gène *sul1* étaient comprises entre  $2 \cdot 10^8$  et  $2 \cdot 10^{10}$  copie/ g poids sec et celles du gène *sul2* variaient de  $5 \cdot 10^9$  à  $2,5 \cdot 10^9$  copies / g de poids sec (Ma *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2016). Bien que les deux gènes soient systématiquement recherchés dans les différentes études, le gène *sul1* est le plus couramment détecté dans les fumiers, les sols, les eaux usées et les eaux de surface des parcs d'engraissement des animaux (Dungan *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016).

### 3.3. Gènes de résistance aux $\beta$ -lactamines

La résistance aux  $\beta$ -lactames est due à la production par les bactéries d'enzymes appelées  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Les BLSE dégradent les cycles  $\beta$ -lactames présents chez les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. La dégradation du cycle  $\beta$ -lactame entraîne l'inactivation de l'antibiotique et la résistance des bactéries vis-à-vis de l'antibiotique. Chaque enzyme BLSE est un variant, classé selon sa séquence en acides aminés ou son mode d'action, dans l'une des neuf familles existantes : TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES et OXA (Gniadkowski, 2001; Jacoby, 2006). En 2006, Jacoby (2006) a recensé 411 gènes *bla* (150 GRA pour la famille TEM, 88 pour SHV, 88 pour OXA, 53 pour CTX-M, 20 pour IMP, 12 pour VIM). Peu présente lors de la découverte des

premières BLSE, la famille des CTX-M s'est répandue rapidement dans le monde. Alors qu'elle comptait une cinquantaine de variants en 2008 (Rossolini *et al.*, 2008), cette famille en possédait plus de 150 en 2014 (Lahlaoui *et al.*, 2014). Actuellement, on dénombre plus de 1 000 variants des gènes *bla* (Jia *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2020). Contrairement aux autres GRA qui sont majoritairement quantifiés par PCR en temps réel, les gènes *bla* sont souvent recherchés dans des isolats d'entérobactéries. Il existe néanmoins quelques données sur l'abondance de ces gènes dans les effluents d'élevage. Ainsi Ma *et al.* (2019) ont rapporté une concentration en gènes *bla*<sub>VIM</sub> dans les fumiers bovins de  $8 \times 10^6$  copies/g poids sec. J. Zhang *et al.* (2019) ont observé des concentrations en gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> et *bla*<sub>TEM</sub> de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  copies/g poids sec dans du fumier porcin.

Les gènes *bla* les plus retrouvés dans les isolats d'entérobactéries de lisiers porcins sont les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub>. D'autres GRA tels que *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> et *bla*<sub>DHA</sub> ont également été détectés (Chah *et al.*, 2018; Dahms *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2020; Shin *et al.*, 2017; J. Zhang *et al.*, 2019). Les  $\beta$ -lactamines étant régulièrement utilisées pour traiter les mammites, leurs gènes de résistance associés sont retrouvés dans les fumiers et lisiers issus d'élevages bovins (Binh *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2017; Oliver *et al.*, 2020; Udikovic-Kolic *et al.*, 2014; Wichmann *et al.*, 2014). Les bovins représentent donc un réservoir important d'entérobactéries productrices de BLSE (Mir *et al.*, 2018, 2016). Les gènes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> et/ou *bla*<sub>CTX-M-9</sub> sont couramment identifiés (Chen *et al.*, 2017). Cependant la présence des gènes *bla* n'est pas forcément reliée aux traitements des animaux par les antibiotiques. Mir *et al.* (2016) ont ainsi mis en évidence une prévalence 15,8% d'entérobactéries résistantes au céfotaxime dans les fèces de bovins élevés sans antibiotiques. Les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> étaient prédominants chez ces bactéries (100% des isolats résistants). En plus des gènes *bla*<sub>CTX-M</sub>, les isolats pouvaient être porteurs d'autres gènes tels que *bla*<sub>SHV</sub> (13%), *bla*<sub>OXA-2</sub> (39%) et *bla*<sub>VEB</sub> (30%). Mir *et al.* (2016) ont également observé que 35% des isolats hébergeaient plus de trois gènes *bla*.

Saliu *et al.* (2017) ont rapporté une prédominance des gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> dans les fientes de volaille et dans une moindre mesure des gènes-*bla*<sub>SHV</sub> et *bla*<sub>TEM</sub>.

### 3.4. Gènes de résistance aux macrolides

Les macrolides, telles l'érythromycine et la tylosine, sont souvent administrés avec des lincosamides et des streptogramines en production animale (Luby *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2015). Les gènes de résistance aux macrolides majoritairement représentés chez les bactéries sont les gènes *erm* (erythromycin ribosome methylase), notamment les gènes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, *ermG*, *ermT*, *ermQ* et *ermX*) et par le gène *mefA*. L'un des mécanismes de résistance aux macrolides consiste en une modification de la cible, elle-même associée à une méthylase codée par les gènes

*erm*. La méthylation de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S des ribosomes bloque la fixation de l'ensemble des macrolides lincosamides et streptogramines B (MLS<sub>B</sub>) sur leur cible (Bingen, 2005). Le deuxième mécanisme de résistance est un mécanisme de résistance par efflux, codé par le gène *mefA* (Clancy *et al.*, 1996). Dans les fumiers porcins, les concentrations (exprimées en copies de gènes / g de poids sec) en gènes *erm* et *mefA* sont de l'ordre de  $10^8$  à  $10^9$  (*ermF*, *mefA*) et de  $10^9$  (*ermB*, *ermX*, *ermQ*) (J. Zhang *et al.*, 2019, 2018). Ma *et al.* (2019) ont rapporté des concentrations du même ordre de grandeur dans des fumiers bovins pour les gènes *ermF*, *ermX* et *ermQ* :  $1,8 \cdot 10^8$ ,  $1 \cdot 10^9$  et  $5 \cdot 10^9$  copies/g de poids sec, respectivement.

### 3.5. Gènes de résistance aux polymyxines (colistine) et aux quinolones

La colistine est un antibiotique qui est utilisé en santé animale pour la prévention et le traitement de maladies gastro-intestinales causées par les entérobactéries (Davis and Janssen, 2020; Lima *et al.*, 2019). Actuellement, dix gènes *mcr* ont été identifiés (*mcr-1* à *mcr-10*) (Wang *et al.*, 2020). Leur mécanisme d'action fait appel à une phosphatidyléthanolamine transférase. L'enzyme transfère un résidu de phosphoéthanolamine au lipide A présent dans la membrane cellulaire des bactéries à Gram négatif (Wang *et al.*, 2020). Le gène *mcr-1* est le gène de résistance à la colistine le plus retrouvé, en particulier chez les animaux d'élevage. Il est principalement transporté par des *E. coli* résistants à la colistine sur divers types de plasmides conjugatifs dont les plasmides de la famille IncX4, IncI1, IncFII, IncFIB, IncX1 et IncQ1 (Brauer *et al.*, 2016; Guenther *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017). Xia *et al.* (2019) ont rapporté des abondances relatives du gène *mcr-1* dans des effluents porcins, comprises entre  $5,4 \cdot 10^{-5}$  et  $2 \cdot 10^{-2}$  copies de *mcr-1*/ copies d'ADNr 16S. Ces auteurs ont mis en évidence une corrélation entre la concentration en résidus de colistine dans les lisiers et l'abondance relative du gène *mcr-1*. Gao *et al.* (2019) ont quantifié le gène *mcr-1* dans différents types d'effluents (porcins, bovins et volailles). Dans les lisiers porcins, les abondances absolues et relatives étaient comprises entre  $2,5 \cdot 10^8$  et  $6,9 \cdot 10^8$  copies *mcr-1*/ g de poids sec ( $2 \cdot 10^{-2}$  et  $1,3 \cdot 10^{-1}$  copies de *mcr-1*/ copies d'ADNr 16S). Elles étaient de  $1,4 \cdot 10^8$  copies *mcr-1*/ g de poids sec ( $7,2 \cdot 10^{-1}$  copies de *mcr-1*/ copies d'ADNr 16S) dans les fumiers bovins et elles étaient comprises entre  $1,9 \cdot 10^7$  et  $6,1 \cdot 10^8$  copies *mcr-1*/ g de poids sec ( $6,3 \cdot 10^{-3}$  et  $1,5 \cdot 10^{-1}$  copies de *mcr-1*/ copies d'ADNr 16S) dans les fientes de volailles. Les effluents d'élevage peuvent donc représenter un potentiel réservoir de gène *mcr*.

Les quinolones sont utilisées pour traiter les bovins et des résidus de ces antibiotiques ont été retrouvés dans les effluents d'élevage (Jacoby *et al.*, 2020; Meradi *et al.*, 2011). Le mécanisme principal de résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones implique une accumulation de mutations au sein des gènes codant pour les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV (cibles principales de ces antibiotiques) à l'exemple des gènes *aac(6')Ib-cr* et *gyrA*, impliqués dans la

réplication de l'ADN. Les gènes de résistance aux fluoroquinolones *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* et *qnrVC* produisent un pentapeptide qui protège l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, induisant l'inhibition des quinolones (Jacoby *et al.*, 2020). Zhang *et al.* (2018) ont rapporté des concentrations en gènes *qnrA* et *qnrS* dans le lisier porcin de  $1 \cdot 10^5$  et  $1 \cdot 10^7$  copies/ g de poids sec, respectivement. Ma *et al.*, (2019) ont rapporté une concentration en *aac(6')Ib-cr* de  $2 \cdot 10^9$  copies/g de poids sec dans les fumiers d'origine bovine.

## 4. Impact sanitaire de la digestion anaérobie

### 4.1. Impact sur les pathogènes et les indicateurs d'efficacité de traitement

Les effluents d'élevage alimentent les méthaniseurs en micro-organismes d'origine entérique dont l'inactivation dépend de multiples facteurs tels que les facteurs intrinsèques au micro-organisme (métabolisme, type de paroi, capacité à produire des formes de résistance), les facteurs microbiologiques (compétition pour la source de nutriments, phénomènes d'antagonismes microbiens), l'accessibilité au substrat, la concentration en produits intermédiaires de la digestion anaérobie (AGV, ammoniac) et les paramètres opérationnels de la méthanisation (temps de séjour hydraulique (TSH), charge organique, température, application d'un prétraitement thermique) (Jiang *et al.*, 2020). Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses études qui visent à améliorer la production de biogaz sans se préoccuper de la qualité sanitaire du digestat obtenu (Bi *et al.*, 2020, 2019; Carrère *et al.*, 2008; Cavinato *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2017). L'impact hygiénisant de la méthanisation est estimé par le dénombrement des bactéries indicatrices d'efficacité de traitement telles que les coliformes totaux, *E. coli* et les entérocoques (**Tableau 6**). En raison de leurs faibles concentrations, proches du seuil de quantification des méthodes, de la lourdeur et du coût élevé des protocoles de dénombrement, la plupart des données concernant les bactéries pathogènes sont qualitatives (présence/ absence dans un volume ou un poids donné). Lorsqu'elles existent, les données quantitatives sont généralement obtenues par des ensemencements artificiels des bactéries pathogènes dans les effluents entrant dans les pilotes (Ottoson *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2016; Pandey et Soupir, 2011).

**Tableau 6: Travaux rapportant l'impact de la méthanisation sur les bactéries (*E.coli*, coliformes totaux, *Salmonella*, entérocoques et *C. perfringens*) (Adapté de Jiang *et al.* (2020))**

Bactérie	Matrice	T (°C)	Durée <sup>a</sup> (jours)	C <sub>i</sub> <sup>b</sup>	C <sub>d</sub> <sup>c</sup>	Abt (Log <sub>10</sub> )	Références
<i>E. coli</i> Batch	FB <sup>d</sup>	25	60	6,5 10 <sup>7</sup>	< 10 <sup>2</sup>	>6	(Pandey et Soupir, 2011)
	FB	35	62	3,6 10 <sup>5</sup>	LD <sup>e</sup>	3,6	(Manyi-Loh <i>et al.</i> , 2014)
	FB	37	41	1,85 10 <sup>7</sup>	<10 <sup>3</sup>	6	(Pandey et Soupir, 2011)
	FB	52,5	3,5	2,5 10 <sup>7</sup>	LD	>7	" "
	FB	37	6	6 10 <sup>4</sup>	LD	5	(Watcharasukarn <i>et al.</i> , 2009)
	LP <sup>f</sup> + DA <sup>g</sup>	37	4	6,3 10 <sup>4</sup>	LD	2,8	(Jiang <i>et al.</i> , 2018b)
	LP + DA	37	7	7,9 10 <sup>8</sup>	LD	6,9	" "
	FB + DC <sup>h</sup>	38	75	10 <sup>4</sup>	LD	4	(Arias <i>et al.</i> , 2020)
	LB + CS <sup>i</sup>	37	21	10 <sup>7</sup>	LD	7	(Hupfauf <i>et al.</i> , 2020)
	LB + CS	45	21	10 <sup>7</sup>	LD	7	" "
	LB + CS	55	21	10 <sup>7</sup>	LD	7	" "
	LB	25	34	6,3 10 <sup>7</sup>	6,3 10 <sup>4</sup>	3	(Pandey <i>et al.</i> , 2016)
	LB	37	34	1,6 10 <sup>7</sup>	1,6 10 <sup>4</sup>	3	" "
LB	52,5	34	8 10 <sup>5</sup>	8 10 <sup>2</sup>	3	" "	
<i>E. coli</i> Continu	LP	24	7 - 14	4 10 <sup>2</sup> - 5,8 10 <sup>5</sup>	nd <sup>j</sup>	0,9-2,9	(Massé <i>et al.</i> , 2011)
	LP + DA	39	41	~10 <sup>4</sup>	<3 10 <sup>2</sup>	1,5-2,5	(Dennehy <i>et al.</i> , 2018)
	LP + DA	39	29	~10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>2</sup>	2 - 2,5	" "
	LP + DA	39	21	~10 <sup>4</sup>	< 3 10 <sup>2</sup>	1,5 - 2	" "
	LP	39	28	1,5 10 <sup>4</sup>	1,9 10 <sup>3</sup>	0,9	(Orzi <i>et al.</i> , 2015)
	LP + DC	42	40-45	10 <sup>2</sup>	2,6 10 <sup>2</sup>	-0,4	" "
	LP + DA	39	35-40	2,2 10 <sup>4</sup>	7 10 <sup>2</sup>	1,5	" "
	LP + DC	39	40	2 10 <sup>5</sup>	3,6 10 <sup>2</sup>	2,7	" "
	LP + DC	39	70	4,6 10 <sup>5</sup> - 1,5 10 <sup>4</sup>	LD - LD	> 3,7 - >2,2	" "
	FB + DC	39	35-40	7 10 <sup>2</sup> - 3,8 10 <sup>4</sup>	LD - LD	> 0,8 - > 2,6	" "
	FB + DC	39	20	1,5 10 <sup>4</sup> - 8,5 10 <sup>4</sup>	1 10 <sup>2</sup> - 7 10 <sup>2</sup>	> 2,2 - 2,1	(Orzi <i>et al.</i> , 2015)
	FB	45	55	10 <sup>3</sup>	LD	3	(Popova <i>et al.</i> , 2013)
	FB	33	55	10 <sup>3</sup>	nd	~0,5	" "
	FB	55	7 - 8	0,5 10 <sup>6</sup> - 1,4 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>2</sup>	> 4	(Aitken <i>et al.</i> , 2005)
	FB	38	40	10 <sup>9</sup>	LD	7	(Qi <i>et al.</i> , 2018)
	FB + DA	38	30	9,5 10 <sup>7</sup>	LD	6	" "
	FB	35-38	20	4 10 <sup>5</sup>	3,2 10 <sup>3</sup>	2,1	(Chiapetta <i>et al.</i> , 2019)
	LP + DA	40	90	nd	8	nd	(Coelho <i>et al.</i> , 2018)
	LB	27	22	nd	15	nd	" "
	LB	38	40-50	nd	LD	nd	" "
	LB + DA	38	40	nd	LD	nd	" "
	LP	40	40	6,7 10 <sup>4</sup>	1,3 10 <sup>4</sup>	0,7	(Le Maréchal <i>et al.</i> , 2019)
FB + FV <sup>k</sup>	38,5	70	4 10 <sup>5</sup>	2,6 10 <sup>3</sup>	2,2	" "	
LP	27	44	1,7 10 <sup>5</sup>	1,1 10 <sup>4</sup>	1,2	" "	
LP + FB	41	65	4,2 10 <sup>4</sup>	3,3 10 <sup>2</sup>	2,1	" "	
LP + FB	39,5	64	3,1 10 <sup>4</sup>	9,4 10 <sup>1</sup>	2,5	" "	
Coliformes totaux Batch	FB	38	14	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	LD	2 - 3	(Varel <i>et al.</i> , 2012)
	FB	55	1	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	LD	2 - 3	" "
	FB	22	28	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	~ 10 <sup>2</sup>	2 - 3	" "
	LP	22	25	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	~ 10 <sup>3</sup>	2 - 3	" "
	LP	38	3	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	LD	3 - 4	(Varel <i>et al.</i> , 2012)
	LP	55	1	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	LD	3 - 4	" "
	LP + DA	37	4	3,2 10 <sup>5</sup>	LD	3,5	(Jiang <i>et al.</i> , 2018b)

**Tableau 6 (suite)**

Bactérie	Matrice	T (°C)	Durée <sup>a</sup> (jours)	C <sub>i</sub> <sup>b</sup>	C <sub>d</sub> <sup>c</sup>	Abt (Log <sub>10</sub> )	Références
	LP + DA	37	7	10 <sup>9</sup>	LD	7	(Jiang <i>et al.</i> , 2018b)
	FB + DC	38	75	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	1	(Arias <i>et al.</i> , 2020)
Coliformes totaux Continu	LP	24	7 - 14	5 10 <sup>2</sup> - 1,6 10 <sup>6</sup>	nd	0,9 - 3	(Massé <i>et al.</i> , 2011)
	LP	37 - 43	40 - 56	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	2,8	(Costa <i>et al.</i> , 2017)
	LP + DA	39	41	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	1 - 4	(Dennehy <i>et al.</i> , 2018)
	LP + DA	39	29	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	1 - 2	" "
	LP + DA	39	21	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	1 - 2	" "
	FB	45	55	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	1	(Popova <i>et al.</i> , 2013)
	FB	33	55	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	1	" "
	LB	48	90	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	~ 10 <sup>2</sup>	2,2	(Costa <i>et al.</i> , 2017)
	FB	55 et 35 <sup>1</sup>	14	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>7</sup>	LD	5 - 7	(Harikishan et Sung, 2003)
	LB + DC	39	20	2 10 <sup>4</sup> - 6,1 10 <sup>4</sup>	LD - 2,1 10 <sup>3</sup>	4 - 5,6	(Orzi <i>et al.</i> , 2015)
LB + DC	39	35 - 40	7 10 <sup>3</sup> - 1,4 10 <sup>4</sup>	LD	3 - 4	" "	
Salmonella Batch	LP + DA	37	6	8,2 10 <sup>5</sup>	LD	5,9	(Jiang <i>et al.</i> , 2018a)
	LP + DA	37	7	5,9 10 <sup>3</sup>	LD	3,8	" "
	FB	35	133	7,4 10 <sup>3</sup>	LD	1,9	(McCarthy <i>et al.</i> , 2013)
	LB + CS	37	21	10 <sup>5</sup>	LD	5	(Hupfauf <i>et al.</i> , 2020)
	LB + CS	45	21	10 <sup>5</sup>	LD	> 5	" "
	LB + CS	55	21	10 <sup>5</sup>	LD	5	(Hupfauf <i>et al.</i> , 2020)
Salmonella Continu	LP	24	7 - 14	10 <sup>2</sup> - 5 10 <sup>4</sup>	nd	0,9 - 1,4	(Massé <i>et al.</i> , 2011)
	FB	55 et 35	14	10 <sup>3</sup> - 1,5 10 <sup>3</sup>	<1	> 3	(Harikishan et Sung, 2003)
	FB	38	40	1,35 10 <sup>10</sup>	LD	8,1	(Qi <i>et al.</i> , 2018)
	FB + DA	38	30	9,5 10 <sup>9</sup>	LD	8	" "
	FB	37	20-30	6,3 10 <sup>3</sup>	7,6 10 <sup>3</sup>	-0,08	(Burch <i>et al.</i> , 2018)
	LP + DA	40	90	nd	LD	nd	(Coelho <i>et al.</i> , 2018)
	LB	27	22	nd	LD	nd	" "
	LB	38	40-50	nd	LD	nd	" "
	LB + DA	38	40	nd	LD	nd	" "
	LP	40	40	2	4,5	nd	(Le Maréchal <i>et al.</i> , 2019)
	FB + FV	38,5	70	6,1	<1,3	nd	" "
	LP	27	44	2,4 10 <sup>2</sup>	<1,3	2	" "
	LP + FB	41	65	7,1 10 <sup>2</sup>	<1,3	2	" "
LP + FB	39,5	64	22	<1,3	nd	" "	
Entérocoques Batch	LP et LB	35	12,5	nd	nd	4	(Lund <i>et al.</i> , 1996)
	LP + DA	37	31	1,6 10 <sup>9</sup>	LD	7,2	(Jiang <i>et al.</i> , 2018b)
	LP + DA	37	12 - 26	~10 <sup>4</sup>	LD	~3	" "
	FB	37	15	6,6 10 <sup>5</sup>	nd	3,1	(Dennehy <i>et al.</i> , 2018)
	FB	55	2	6,6 10 <sup>5</sup>	nd	1,7	" "
	FB + DC	38	75	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup>	3	(Arias <i>et al.</i> , 2020)
Entérocoques Continu	LP	24	7 - 14	1,8 10 <sup>4</sup> - 1,7 10 <sup>6</sup>	nd	0,9 - 1,4	(Massé <i>et al.</i> , 2011)
	LP + DA	39	41	~10 <sup>5</sup>	~10 <sup>3</sup>	2-3	(Dennehy <i>et al.</i> , 2018)
	LP + DA	39	29	~10 <sup>5</sup>	~10 <sup>3</sup>	~2	" "
	LP + DA	39	21	~10 <sup>5</sup>	~10 <sup>3</sup>	2-3	" "
	FB	33	55	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup>	2-3	(Popova <i>et al.</i> , 2013)
	FB + DA	35	nd	4 10 <sup>4</sup>	4 10 <sup>4</sup>	0	(Bonetta <i>et al.</i> , 2011)
	LP	39	28	3 10 <sup>4</sup>	2,6 10 <sup>1</sup>	3,1	(Orzi <i>et al.</i> , 2015)
	LP + DC	42	40-45	1,15 10 <sup>3</sup>	6 10 <sup>2</sup>	0,3	" "
	LP + DC	30-35	40	1,75 10 <sup>3</sup>	LD	1,2	" "
	LP + DA	39	35-40	1,4 10 <sup>4</sup>	1,9 10 <sup>3</sup>	0,9	" "

**Tableau 6 (suite)**

Bactérie	Matrice	T (°C)	Durée <sup>a</sup> (jours)	C <sub>i</sub> <sup>b</sup>	C <sub>d</sub> <sup>c</sup>	Abt (Log <sub>10</sub> )	Références
	LP + DC	39	40	8 10 <sup>4</sup>	2,22 10 <sup>2</sup>	2,6	(Orzi <i>et al.</i> , 2015)
	LP + DC	39	70	1,6 10 <sup>4</sup> – 1,0 10 <sup>4</sup>	7 10 <sup>3</sup> -LD	0,4 -> 2	" "
	FB + DC	39	35-40	2,0 10 <sup>5</sup> – 1,6 10 <sup>3</sup>	3,8 10 <sup>2</sup> – 2,5 10 <sup>2</sup>	1,7 - 2,8	" "
	FB + DC	39	20	2,8 10 <sup>4</sup> – 1,0 10 <sup>5</sup>	3,5 10 <sup>2</sup> - 9 10 <sup>2</sup>	1,9 - 2,1	" "
	FB	38	40	1,6 10 <sup>9</sup>	LD	7,2	(Qi <i>et al.</i> , 2018)
	FB + DA	38	30	1,3 10 <sup>10</sup>	LD	8,1	" "
	LB	35	67	3,5 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	1,2	(Luste <i>et al.</i> , 2012)
	FB	35-38	20	5 10 <sup>5</sup>	8 10 <sup>4</sup>	0,8	(Chiapetta <i>et al.</i> , 2019)
	LP	40	40	1,8 10 <sup>4</sup>	2, 10 <sup>5</sup>	-1,2	(Le Maréchal <i>et al.</i> , 2019)
	FB + FV	38,5	70	1,2 10 <sup>5</sup>	1,8 10 <sup>5</sup>	-0,2	" "
	LP	27	44	9,4 10 <sup>4</sup>	1,4 10 <sup>4</sup>	0,8	" "
	LP + FB	41	65	6,8 10 <sup>4</sup>	2,2 10 <sup>4</sup>	0,5	" "
LP + FB	39,5	64	1,2 10 <sup>4</sup>	9,7 10 <sup>4</sup>	-0,9	" "	
<i>C. perfringens</i> Batch	FB	37	15	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	nd	1,35	(Watcharasukarn <i>et al.</i> , 2009)
	FB	55	2	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	nd	< 1	" "
<i>C. perfringens</i> Continu	LP	24	7 - 14	10 <sup>3</sup> - 3,7 10 <sup>6</sup>	nd	0 - 0,2	(Massé <i>et al.</i> , 2011)
	LP	39	28	2,1 10 <sup>4</sup>	8 10 <sup>3</sup>	0,4	(Orzi <i>et al.</i> , 2015)
	LP + DC	42	40-45	2,5 10 <sup>5</sup>	3,8 10 <sup>5</sup>	-0,2	" "
	LP + DC	30-35	40	6,08 10 <sup>4</sup>	7,5 10 <sup>4</sup>	- 0,1	" "
	LP + DA	39	35-40	8 10 <sup>3</sup>	5,5 10 <sup>3</sup>	0,2	" "
	LP + DC	39	40	6,9 10 <sup>4</sup>	2,2 10 <sup>4</sup>	0,4	" "
	LP + DC	39	70	2 10 <sup>5</sup> - 6 10 <sup>5</sup>	7,5 10 <sup>2</sup> – 1,3 10 <sup>4</sup>	2,4 - 1,8	" "
	FB + DC	39	35-40	1,7 10 <sup>6</sup> - 4 10 <sup>6</sup>	4 10 <sup>3</sup> - 5,5 10 <sup>2</sup>	2,6 - 3,9	" "
	FB + DC	39	20	2,5 10 <sup>4</sup> – 3,9 10 <sup>4</sup>	4 10 <sup>3</sup> - 5 10 <sup>3</sup>	-0,5 - 0,9	" "
	FB	48	90	1,9 10 <sup>5</sup>	1 10 <sup>6</sup>	-0,74	(Costa <i>et al.</i> , 2017)
	FB	37	20-30	2,2 10 <sup>4</sup>	2,9 10 <sup>4</sup>	-0,04	(Burch <i>et al.</i> , 2018)
	LP	40	40	1,2 10 <sup>5</sup>	8,6 10 <sup>4</sup>	0,1	(Le Maréchal <i>et al.</i> , 2019)
	FB + FV	38,5	70	2,4 10 <sup>3</sup>	1,8 10 <sup>3</sup>	0,3	" "
	LP	27	44	6,4 10 <sup>5</sup>	7,6 10 <sup>5</sup>	-0,1	" "
LP + FB	41	65	1,1 10 <sup>5</sup>	2,7 10 <sup>4</sup>	0,6	" "	
LP + FB	39,5	64	2,5 10 <sup>5</sup>	4 10 <sup>4</sup>	0,8	" "	

<sup>a</sup> TSH pour le continu, durée d'incubation pour le batch, <sup>b</sup> C<sub>i</sub> : concentration des bactéries dans les effluents (UFC ou NPP /g ou /mL) ; <sup>c</sup> C<sub>d</sub> : concentration des bactéries dans les digestats (UFC ou NPP /g ou /mL) ; <sup>d</sup> FB : fumier bovin ; <sup>e</sup> LD : Limite de détection ; <sup>f</sup> LP : Lisier porcin ; <sup>g</sup> DA : déchets alimentaires ; <sup>h</sup> DC : Déchets de cultures ; <sup>i</sup> LB +CS : Lisier bovin + co-substrat ; <sup>j</sup> nd : non déterminé ou non donné dans l'article ; <sup>k</sup> FV : Fumiers de volailles ; <sup>l</sup> 4 jours à 55°C puis 10 jours à 35°C.

Comme le montre le **Tableau 6**, l'impact de la méthanisation sur les bactéries est très variable, les valeurs des abattements fluctuant de 0 à 7,2 Log<sub>10</sub>, selon les études. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences à l'exemple de la structure et de la physiologie des bactéries (§ 4.1.1), de la température (§ 4.1.2), du temps de séjour, de la charge organique (§ 4.1.3) et de la concentration en AGV et en ammoniac (§ 4.1.4).

La plupart des données de la littérature scientifique concernent la méthanisation mésophile. La **Figure 19** synthétise les valeurs des abattements du **Tableau 6** pour les indicateurs d'efficacité de traitement (*E. coli*, coliformes totaux et entérocoques) ainsi que pour *Salmonella* et *C. perfringens* en

conditions mésophiles. Une seule donnée étant disponible pour les procédés batch pour *C. perfringens*, celle-ci n'a pas été reportée sur la Figure 19. Malgré les fortes variations observées pour chaque bactérie, indépendantes du TSH ou de la durée de l'expérience, il ressort que les procédés batch conduisent à des abattements plus élevés que les procédés fonctionnant en continu, ce qui peut s'expliquer par l'absence d'apport continu de bactéries provenant des effluents lorsque le système fonctionne en batch. En procédé continu, les abattements des concentrations en entérocoques et en *C. perfringens* sont plus faibles que celles des entérobactéries. Indépendamment de la bactérie, en procédés continus, les concentrations sont parfois plus élevées dans les digestats que dans les effluents entrant, conduisant à des valeurs négatives des abattements (**Figure 19B**). Cela peut s'expliquer par un développement bactérien ou par un biais analytique, les prélèvements en entrée et en sortie de digesteur étant généralement réalisés le même jour sans tenir compte du TSH.

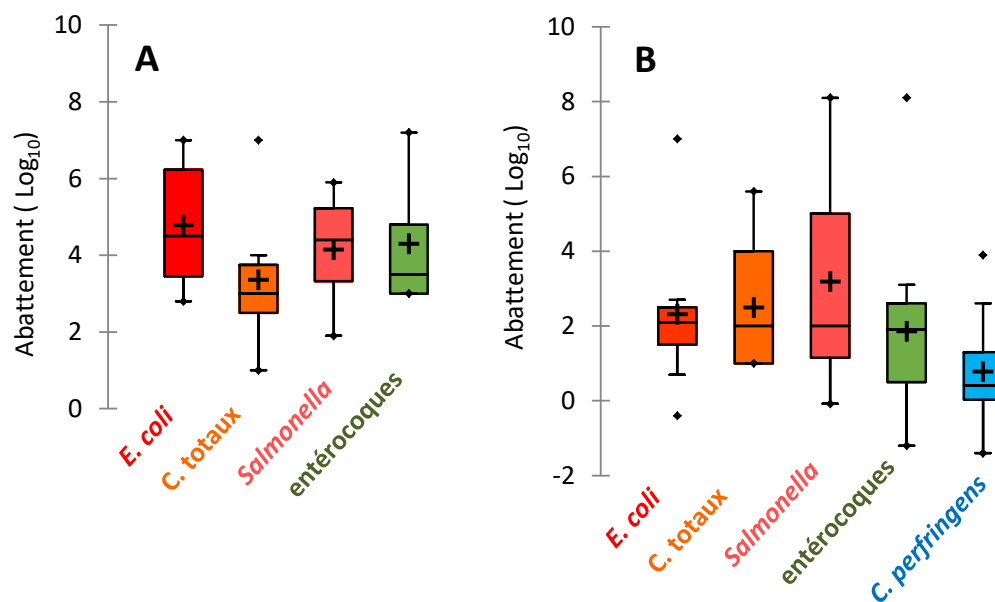


Figure 19 : Valeurs des abattements de bactéries indicatrices d'efficacité de traitement et de deux pathogènes en batch (A) et en continu (B) en conditions mésophiles (Le signe + indique la valeur moyenne). C. totaux : coliformes totaux. Les valeurs sont tirées du Tableau 6.

#### 4.1.1. Facteurs intrinsèques

L'intégrité mécanique et la perméabilité de la paroi sont les deux principaux mécanismes de protection des bactéries (Dijkstra et Keck, 1996). Les bactéries à Gram négatif dont la paroi est constituée d'une membrane externe et d'une monocouche de peptidoglycane sont plus fragiles que les bactéries à Gram positif dont la paroi est composée d'acides teichoïques et d'une épaisse couche de peptidoglycane. Leur sensibilité vis-à-vis des températures thermophiles ou mésophiles, des teneurs AGV et en ammoniac (Himathongkham *et al.*, 2000; Watcharasukarn *et al.*, 2009) peut



expliquer les valeurs d'abattelements plus élevées des entérobactéries par rapport celles observées pour les entérocoques et *C. perfringens* (Figure 19B).

#### **4.1.2. Impact de la température**

Les données concernant la méthanisation thermophile des effluents d'élevage sont trop parcellaires pour qu'elles puissent être comparées à celles obtenues en méthanisation mésophile. Néanmoins, la digestion anaérobie thermophile permet une réduction plus importante des formes végétatives des bactéries que la digestion mésophile comme l'illustrent les expériences réalisées par Lloret *et al.* (2013b) et López *et al.* (2020) en pilotes alimentés en semi continu par des boues de station d'épuration. En appliquant un TSH de 50 jours, Lloret *et al.* (2013b) ont observé un abattement des concentrations en *E. coli* de 2 Log<sub>10</sub> à 35°C et supérieur à 4 Log<sub>10</sub> à 55°C. López *et al.* (2020) ont observé un abattement des concentrations en entérocoques de 1,2 Log<sub>10</sub> à 35-36°C et de 4 Log<sub>10</sub> à 54-55°C pour un TSH de 15 jours. En revanche, qu'elle soit mésophile ou thermophile, la méthanisation n'affecte pas, ou très peu, la persistance des formes sporulées (Aitken *et al.*, 2005; Lloret *et al.*, 2013a; Rounsefell *et al.*, 2012).

La méthanisation mésophile, procédé le plus courant en France, conduit à une réduction peu marquée des bactéries indicatrices d'efficacité de traitement, les valeurs d'abattement les plus fréquemment rapportées dans les procédés continus étant inférieures à 2,5 Log<sub>10</sub> (Chen *et al.*, 2012; Erkan and Sanin, 2013; Guzmán *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2007; Lloret *et al.*, 2013b).

#### **4.1.3. Impact du TSH et de la charge organique**

Les travaux sur l'influence du TSH rapportent des résultats contradictoires. Chen *et al.* (2012) ont observé que l'allongement du TSH de 11 à 25 jours augmentait les abattements des teneurs en *E. coli* et en *Salmonella*. En revanche, Coelho *et al.* (2011) n'ont constaté aucun impact du TSH (entre 5 et 20 jours) sur les coliformes totaux, au cours de la digestion anaérobie de boues de station d'épuration.

Seules deux études ont porté sur l'effet de la charge organique sur le comportement des bactéries d'origine entérique. Skillman *et al.* (2009) ont observé que des valeurs de charge organique de 2,2 à 6,4 g DCO L<sup>-1</sup>. J<sup>-1</sup> dans du lisier de porc maintenu à 55°C n'a pas eu d'impact sur les teneurs en *C. perfringens* dans les digestats. Mais ce résultat peut être expliqué par le temps de séjour très court de la biomasse dans le pilote (TSH de 2 jours). Rosenblum *et al.* (2015) ont mené des expériences sur des digesteurs anaérobies semi-continus alimentés par du lisier bovin et fonctionnant en psychrophilie (10 et 27,5°C), avec trois charges organiques (0,3, 0,8 et 1,3 kg VS m<sup>-3</sup>

<sup>3</sup>.jour<sup>-1</sup> correspondant à des TSH de 188,3 ; 70,6 et 43,3 jours respectivement). La charge organique la plus faible a conduit à la plus forte réduction des teneurs en *E. coli* et entérocoques. Cependant, la charge organique étant négativement corrélée au TSH, il est difficile d'estimer si les effets observés sont dus à l'un des deux paramètres ou à une combinaison des deux.

Les variations de TSH et de charge organique peuvent agir indirectement sur les bactéries *via* l'évolution des teneurs en AGV comme l'ont souligné Salminen et Rintala (2002). Ils ont ainsi montré que l'augmentation de la charge organique et/ou la diminution du TSH provoquait une accumulation des AGV contribuant à l'inhibition des agents pathogènes.

#### **4.1.4. Impact des concentrations en AGV et en ammoniac**

Des teneurs élevées en AGV augmentent la vitesse de réduction des micro-organismes pathogènes (Gao *et al.*, 2013; Kunte *et al.*, 2000; Salsali *et al.*, 2008, 2006). Jiang *et al.* (2018b) ont montré au cours de la digestion anaérobie mésophile de fumier de porc et de déchets alimentaires, un plus fort impact des AGV sur la réduction des teneurs en *E. coli* que sur celles des entérocoques. Ils ont mis en évidence que *E. coli* et les coliformes totaux ont diminué en deçà du seuil de détection après seulement 4 jours lorsque les concentrations en AGV étaient comprises entre 35 et 88 mg/L. Watcharasukarn *et al.* (2009) ont rapporté des résultats similaires. Ils ont constaté une diminution de *E. coli* de 5 Log<sub>10</sub> après 5 jours de digestion de fumier bovin dans des systèmes batch lorsque que la concentration en AGV était comprise entre 56 et 77 mg/L. Au regard de ces résultats, une concentration en AGV entre 35 et 88 mg/L pourrait permettre d'éliminer *E. coli* dans les digestats. Cependant elle ne serait pas suffisante pour diminuer significativement les teneurs en entérocoques. En effet, selon Jiang *et al.* (2018b) la teneur en AGV doit être de 895 mg/L pour que les entérocoques ne soient plus détectés. L'effet inhibiteur des AGV est dépendant du pH. Celui-ci agit sur la conversion des AGV ionisés en AGV libres qui sont toxiques pour les bactéries. De plus, l'effet inhibiteur des AGV dépend de la molécule. Ainsi Jiang *et al.* (2018a), dans une expérience menée en batch en mésophilie sur du fumier porcin et des déchets alimentaires, ont comparé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différents AGV libres (propionate, acétate, butyrate, isobutyrate, acide valérique et acide isovalérique). A pH 7, l'AGV ayant l'effet le plus inhibiteur vis-à-vis de deux souches de *Salmonella* Typhimurium et d'une souche de *Salmonella* Derby était l'acide valérique (93 à 109 mM/L), suivi de l'acide isovalérique (176 à 211 mM/L), du propionate (190 à 236 mM/L), du butyrate (274 à 345 mM/L), de l'isobutyrate (316 à 396 mM/L) et de l'acétate (426 à 640 mM/L).

L'impact de l'ammoniac a été très peu étudié. Orzi *et al.* (2015) ont mesuré une corrélation négative entre les teneurs en NH<sub>3</sub> et les concentrations en *E. coli* et en entérocoques dans des digestats issus de méthaniseurs agricoles mésophiles. Néanmoins, d'autres paramètres tels que le TSH et les teneurs en AGV, qui variaient entre les méthaniseurs, ont pu également impacter le comportement de ces bactéries, rendant difficile l'interprétation de ces données. Jiang *et al.* (2018a) dans des conditions similaires à celles de Jiang *et al.* (2018b) ont étudié l'effet de différentes concentrations en ammoniac sur l'inactivation de trois souches de *Salmonella*. Il ressort de cette étude que les concentrations nécessaires à l'inactivation de *Salmonella* varient entre 646 et 841 mM à pH 7 et 690 et 720 mM à pH 8.

## **4.2. Impact sur les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance aux antibiotiques**

La présence d'antibiotiques dans les effluents, en impactant les micro-organismes impliqués dans la digestion anaérobie, peut entraîner une réduction de la production de biogaz (Beneragama *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2009). Elle peut également conduire à la sélection de BRA et de GRA (Gurmessa *et al.*, 2020).

Peu d'études ont rapporté des données sur le comportement des BRA. Beneragama *et al.* (2013) ont observé au cours de la digestion anaérobie thermophile d'un mélange de lisier et de fumier de bovins, une réduction des bactéries hétérotrophes multirésistantes de 4 Log<sub>10</sub> alors que la digestion mésophile du même substrat n'a entraîné qu'une réduction de 2 Log<sub>10</sub>. Des entérocoques et des entérobactéries multirésistantes ont été mis en évidence dans des effluents bovins alimentant des pilotes de méthanisation (température de 25 à 35°C et TSH de 60 jours) ainsi que dans les digestats issus de ces pilotes (Resende *et al.*, 2014). Schauss *et al.* (2015) ont recherché des *E. coli* BLSE dans les effluents et les digestats de deux méthaniseurs à la ferme mésophiles prélevés chacun 4 fois sur une année. Les *E. coli* BLSE, systématiquement détectés dans les effluents d'entrée, ont également été retrouvés dans 5 des 8 échantillons de digestats.

L'impact de la méthanisation sur les GRA est estimé par des approches quantitatives ciblant des gènes connus (essentiellement les gènes *tet*, *sul*, *erm*, *qnr*, *intl*) ou par approches métagénomiques.

La température de fonctionnement des méthaniseurs impacte les concentrations des GRA, les conditions thermophiles conduisant à une réduction plus importante de ces concentrations que les conditions mésophiles (Diehl et LaPara, 2010; Ghosh *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2020). Ainsi Ghosh *et al.* (2009) ont observé que la digestion mésophile

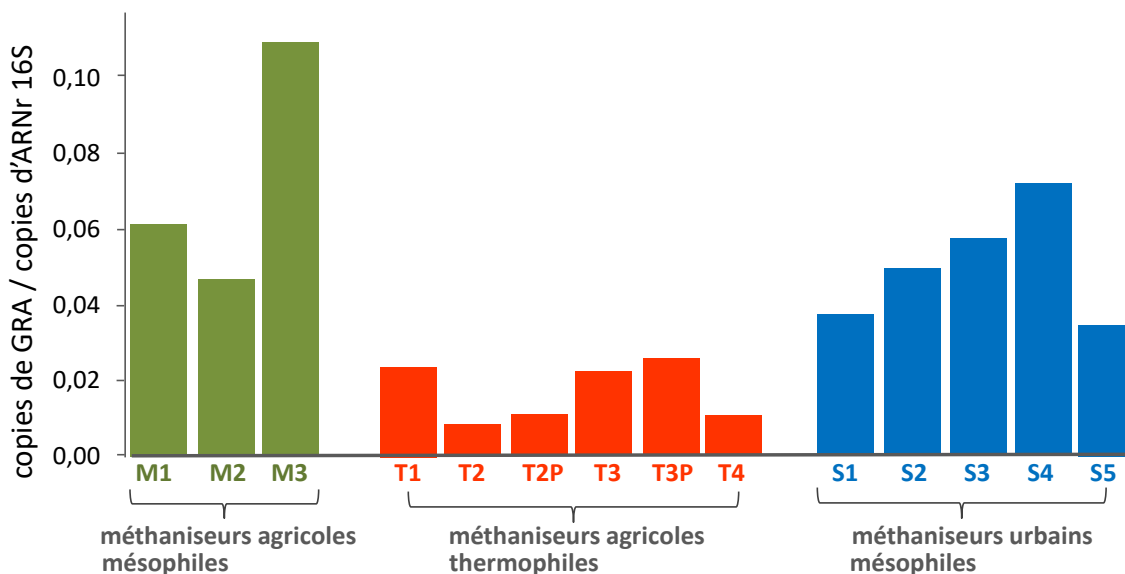
(35-37°C) n'impactait pas la teneur en gènes *tet*, alors la digestion thermophile (50-60°C) diminuait de 85 à 99% les gènes *tet(X)*. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Diehl et LaPara (2010) qui a montré que l'augmentation de température de 37 à 55°C entraînait une diminution des gènes *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(X)* et de l'intégron *int1*. L'étude menée par Ma *et al.* (2011) confirme également qu'il existe une différence marquée entre le traitement anaérobie mésophile et thermophile des boues de stations d'épuration. Ainsi, des digesteurs anaérobies thermophiles à 47, 52 et 59°C ont eu un impact plus important que la digestion mésophile (35°C) sur les gènes *tet(O)*, *tet(W)*, *ermB* et *ermF*. Zou *et al.* (2020) ont observé une réduction de l'abondance absolue des gènes *tet(A)* de 0,7 Log<sub>10</sub> en conditions thermophiles alors que celle-ci a augmenté de 1,2 Log<sub>10</sub> en conditions mésophiles. Un résultat similaire a été observé pour le gène *tet(M)* par Sun *et al.* (2016). Zhang *et al.* (2018) ont également rapporté une augmentation de l'abondance absolue du gène *tet(M)* au cours de la digestion anaérobie mésophile.

Il convient de souligner que le comportement des GRA dépend du gène ciblé. À titre d'exemple, dans une expérience menée en laboratoire par Song *et al.* (2017) sur différents mélanges de lisier porcin et de paille maintenus en anaérobiose à 37°C, l'abondance absolue des gènes *tet(W)*, *tet(C)*, *ermX* et *ermQ* a augmenté de 0,01 à 1,03 Log<sub>10</sub>, tandis que l'abondance absolue des gènes *tet(G)*, *tet(X)*, *ermB*, *sul1*, *sul2* et *dfrA7* a diminué de 0,08 à 1,87 log, les réductions les plus importantes ayant été observées pour les gènes *sul*. Wolters *et al.* (2016) ont quantifié 5 GRA et 5 EGM dans les intrants et les digestats de 8 sites de méthanisation mésophile alimentés par des effluents d'élevages bovins ou porcins. Sur les 5 GRA (*tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(W)*, *sul1*, *sul2*) et les 5 éléments génétiques mobiles analysés (*int1*, *int2*, *korB*, *traN* et *qacE*), tous, à l'exception du gène *tet(W)* dont la teneur relative était plus élevée dans les digestats que dans les intrants, présentaient des abondances relatives plus faibles dans les digestats mais la réduction, de l'ordre de 1 Log<sub>10</sub>, était relativement peu marquée.

Plusieurs études ont mis en évidence, en conditions mésophiles, une diminution de l'abondance absolue des gènes *ermQ* (Ma *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2017; J. Zhang *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2020), *sul1* et *sul2* (Ma *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2016; Wallace *et al.*, 2018; J. Zhang *et al.*, 2019) et *int1* (Ma *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2020). Néanmoins, des augmentations des concentrations en gènes *sul1* (Sun *et al.*, 2019) et *qnr* (J. Zhang *et al.*, 2018) au cours de méthanisation mésophile ont été rapportées.

La répartition des GRA et leurs concentrations sont probablement associées aux communautés bactériennes du digesteur qui subissent elles-mêmes la pression de sélection imposée par les conditions de fonctionnement du digesteur. Toutefois, la persistance de l'ADN résiduel et le transfert horizontal de gènes ne peuvent être exclus.

En utilisant une approche métagénomique, Luo *et al.* (2017) ont comparé la diversité des GRA présents dans sept méthaniseurs à la ferme danois (3 mésophiles (37-40°C) avec un TSH de 21 à 32 jours et 4 thermophiles (50-53°C) avec un TSH de 3 à 24 jours) et dans cinq méthaniseurs urbains mésophiles (36-39°C) avec un TSH de 19 à 30 jours alimentés avec des boues de stations d'épuration. Les abondances relatives des GRA qui variaient entre  $7 \cdot 10^{-3}$  et  $1,08 \cdot 10^{-1}$  copies de GRA/copies gène 16SrRNA étaient plus faibles dans les digestats issus des méthaniseurs thermophiles. L'origine des intrants (urbain vs agricole) impactait moins l'abondance relative des GRA que la température de fonctionnement des méthaniseurs (**Figure 20**). La présence d'un post-digesteur a conduit à une légère augmentation de l'abondance relative des GRA, phénomène également observé par Wolters *et al.* (2016).



**Figure 20:** Abondance relative des GRA dans des digestats issus de 7 méthaniseurs agricoles et de 5 méthaniseurs urbains. Deux des méthaniseurs thermophiles (T2 et T3) possédaient un post digesteur (indiqué par la lettre P) d'après Luo *et al.* (2017).

Parmi les 175 GRA identifiés, sept étaient communs à tous les digestats (essentiellement gènes de résistance aux lincosamides, aux macrolides et aux tétracyclines). Les gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ont été majoritairement retrouvés dans les digestats issus des méthaniseurs urbains alors que les gènes spécifiques des digestats agricoles étaient représentés par les gènes de résistance aux aminoglycosides, aux tétracyclines et le gène de résistance aux macrolides *ermT*. Les paramètres influençant le plus la composition des GRA étaient le type d'intrant (effluent d'élevage vs boues de station d'épuration), la température (mésophile vs thermophile), le TSH ainsi que la concentration en AGV. Ces paramètres, en influençant la composition de la communauté microbienne, déterminent la composition des GRA dans les digesteurs.

## 5. Objectifs du doctorat

En raison de l'essor de la méthanisation à la ferme, notamment en Bretagne, l'épandage des digestats représente l'une des voies de dissémination des bactéries pathogènes et de l'antibiorésistance dans l'environnement agricole. La maîtrise de l'innocuité sanitaire des digestats est donc un enjeu considérable pour les sites de méthanisation. Cependant, peu d'études décrivent l'impact de la méthanisation sur le devenir des BRA et de leurs gènes de résistance ou sur la persistance des bactéries d'origine entérique, notamment des *Clostridia* pathogènes à l'exemple de *C. perfringens*. En particulier, il existe très peu de travaux sur l'influence des paramètres de gestion de la digestion anaérobie tels le TSH, la charge organique ou le prétraitement thermique des effluents d'élevage sur ces bactéries. De nombreuses questions se rapportant à l'aspect sanitaire des digestats restent donc encore en suspens aussi bien pour les agents pathogènes que pour l'antibiorésistance. Or, mieux comprendre l'impact des paramètres de gestion peut conduire à proposer des leviers d'action permettant de limiter le risque sanitaire associé aux digestats.

Les objectifs du travail de thèse qui se décline en trois parties sont :

- 1) d'évaluer l'impact sanitaire de la méthanisation mésophile sur la virulence et l'antibiorésistance d'isolats de *C. perfringens* collectés dans les lisiers et les digestats bruts de trois sites de méthanisation à la ferme (chapitre 2).
- 2) d'étudier en pilotes, alimentés en semi-continu, l'impact de deux paramètres régissant la digestion anaérobie mésophile voie liquide (temps de séjour hydraulique et charge organique) sur la persistance de *E. coli*, des entérocoques et de deux *Clostridia* pathogènes (*C. perfringens* et *C. difficile*) et d'estimer si le prétraitement thermique de 70°C, 1h appliqué au lisier entrant dans les pilotes, contribue à favoriser le développement des *Clostridia* (chapitre 3).
- 3) d'estimer l'impact de ces paramètres sur la composition microbienne des digestats et sur le devenir de 14 GRA et du gène *int1* (chapitre 4).



## **Chapitre 2 : Caractérisation d'isolats de *C. perfringens* collectés sur trois unités de méthanisation à la ferme pendant une année**

---





## Avant-propos

Le développement de la méthanisation à la ferme au cours des 20 dernières années soulève de nombreuses questions sur le plan sanitaire. L'une d'entre-elles concerne le devenir des bactéries pathogènes anaérobies qui sont susceptibles de trouver dans les méthaniseurs des conditions favorables à leur développement. La présence de *C. perfringens* dans les effluents d'élevage à des concentrations de l'ordre  $10^4$  ufc  $g^{-1}$  (Bagge *et al.*, 2005; Orzi *et al.*, 2015), supérieures à celles des autres *Clostridia* pathogènes, sa capacité à résister à de nombreux stress environnementaux et son optimum de croissance à 37°C en conditions anaérobies ont orienté nos recherches sur cette bactérie. *C. perfringens* est subdivisé en sept toxinotypes dont la propagation dans l'environnement via l'épandage des digestats peut représenter un risque sanitaire pour la santé humaine et animale. En effet, outre le toxinotype F, responsable de TIAC, les six autres toxinotypes sont impliqués dans des maladies associées aux animaux d'élevage.

Un total de 157 isolats de *C. perfringens* collectés pendant une année dans les lisiers et les digestats bruts de trois sites de méthanisation agricole mésophile ont été caractérisés. Les objectifs de ce travail étaient de déterminer si la digestion anaérobie favorisait la sélection de certains toxinotypes et de souches multi résistantes aux antibiotiques, les *Clostridia* étant considérées comme de potentiels réservoirs de GRA (Leclercq *et al.*, 2016). Les toxinotypes ont été mis en évidence par PCR en temps réel et la résistance à 17 antibiotiques couramment utilisés pour traiter les bovins et/ou les porcs, a été testée avec la microplaque "Sensititre™ Bovine/porcine". Les données obtenues ont été comparées entre les lisiers et les digestats des trois sites afin de déterminer si l'origine des effluents et le procédé de méthanisation avaient un impact sur les profils de résistance et la distribution des toxinotypes.

# Characterization of *Clostridium perfringens* isolates collected from three agricultural biogas plants over a one-year period

Lorine Derongs<sup>1</sup>, Céline Druilhe<sup>1</sup>, Christine Ziebal<sup>1</sup>, Caroline Le Maréchal<sup>2</sup>, Anne-Marie Pourcher<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRAE, OPAALE Research Unit, CS 64427, F-35044 Rennes, France; [lorine.derongs@inrae.fr](mailto:lorine.derongs@inrae.fr) (L.D); [celine.druilhe@inrae.fr](mailto:celine.druilhe@inrae.fr) (C.D), [christine.ziebal@inrae.fr](mailto:christine.ziebal@inrae.fr) (C.Z); [anne-marie.pourcher@inrae.fr](mailto:anne-marie.pourcher@inrae.fr) (AM.P)

<sup>2</sup> ANSES, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, BP53, F-22440 Ploufragan, France; : [caroline.lemarechal@anses.fr](mailto:caroline.lemarechal@anses.fr) (C.LM)

\* Correspondence: [anne-marie.pourcher@inrae.fr](mailto:anne-marie.pourcher@inrae.fr) ; Tel.:33 (2) 23 48 21 37

Received: 1 July 2020; Accepted: 24 July 2020; Published: 29 July 2020

**Abstract:** Digestate produced by agricultural biogas plants (BGPs) may contain pathogenic bacteria. Among them, *Clostridium perfringens* deserves particular attention due to its ability to grow under anaerobic conditions and to persist in amended soil. The aim of this study was to examine the potential pathogenicity and the antimicrobial resistance of *C. perfringens* in manure and digestate collected from three agricultural biogas plants (BGPs). A total of 157 isolates (92 from manure, 65 from digestate) were screened for genes encoding seven toxins (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe*, *netB*, and *cpb2*). The 138 *cpa* positive isolates were then screened for *tetA*(P), *tetB*(P), *tet*(M) and *erm*(Q) genes and tested for antimicrobial susceptibility. The toxinotypes identified in both manure and digestate were type A (78.3% of the isolates), type G (16.7%), type C (3.6%), and type D (1.4%), whereas none of the isolates were type F. Moreover, half the isolates carried the *cpb2* gene. The overall prevalence of *tetA*(P) gene alone, *tetA*(P)-*tetB*(P) genes, and *erm*(Q) gene was 31.9, 34.8, and 6.5%, respectively. None of the isolates harbored the *tet*(M) gene. Multiple antimicrobial resistant isolates were found in samples collected from all the manure and digestates. Among them, 12.3% were highly resistant to some of the antibiotics tested, especially to clindamycin (MIC  $\geq$  16  $\mu$ g/mL) and tilmicosin (MIC > 64  $\mu$ g/mL). Some isolates were highly resistant to antibiotics used in human medicine including vancomycin (MIC > 8  $\mu$ g/mL) and imipenem (MIC > 64  $\mu$ g/mL). These results suggest that digestate may be a carrier of the virulent and multidrug resistant *C. perfringens*.

**Keywords:** *C. perfringens*, mesophilic anaerobic digestion, manure, digestate, toxinotypes, antimicrobial susceptibility

## 1. Introduction

The number of biogas plants has increased considerably in Europe in the last decade (from 6227 installations in 2009 to 18,202 in 2018) (European Biogas Association, 2019), most of them operating with agricultural substrates. On-farm anaerobic digestion converts livestock manure into biogas and digestate, and the latter is commonly applied to agricultural soils. However, the spread of zoonotic pathogens and antibiotic resistant bacteria potentially present in digestate raises serious concerns. Among these bacteria, *Clostridium perfringens* which causes food poisoning in humans and enteric diseases in domestic animals (Johansson *et al.*, 2006), deserves particular attention due to its persistence in soil amended with manure, digestate, or manure compost (Gómez-Brandón *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2017; Scott *et al.*, 2018). *Clostridia* are also suspected of playing a role in the dissemination of antibiotic resistance genes in manure-amended soil (Lau *et al.*, 2017; Leclercq *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2018). Moreover, *C. perfringens* has been suggested to be a reservoir for conjugative antimicrobial resistance genes (Kather *et al.*, 2006; Soge *et al.*, 2009).

Land application of manure may result in continuous exposure of the agricultural environment to pathogenic and antibiotic resistant bacteria (Scott *et al.*, 2018). This raises issues of human health and food safety (Alegbeleye and Sant'Ana, 2020). Indeed, once contaminated livestock effluents are applied, direct transfer of pathogens to crops and animals may occur (Nag *et al.*, 2019). To date, there is no evidence of environmental transmission of *C. perfringens*, whether or not the bacterium is resistant to antibiotics but one possible transmission route to humans or animals is through consumption of vegetables contaminated by livestock manure (Hamza *et al.*, 2018; Tango *et al.*, 2018). Whether anaerobic digestion of manure can reduce the environmental exposure to antimicrobial-resistant *C. perfringens* shed by farm animals has to be fully addressed. Given the increasing number of reports of antimicrobial resistance in anaerobes over the past two decades (Pence, 2019), it is important to examine the potential pathogenicity and the antimicrobial profiles of *C. perfringens* present in digested manure before its application on agricultural land.

*C. perfringens* is a Gram-positive anaerobic spore forming bacterium that is responsible for various diseases including food poisoning, gas gangrene, enteritis necroticans, and enterotoxemia (Kiu *et al.*, 2019). It is also involved in antibiotic-associated diarrhea (Rood *et al.*, 2018). This bacterium is estimated to be the third most common bacterial cause of food-poisoning cases in the United States (Centers for Disease Control and Prevention, 2019), and is the third most common cause of foodborne outbreaks in France (Anonymous, 2019). *C. perfringens* produces more than 20 toxins and hydrolytic enzymes (Freedman *et al.*, 2015; Uzal *et al.*, 2018). The species is divided into seven types, A to G, according to the presence and combination of four major toxins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ , and  $\iota$ ) encoded by genes *cpa*, *cpb*, *etx*, and *iap*, and two minor toxins (enterotoxin CPE and NetB) encoded by genes *cpe* and *netB* (Rood *et al.*, 2018; Uzal *et al.*, 2018). It also produces the  $\beta_2$  toxin encoded by the *cpb2* gene, which is implicated in several animal gastro intestinal diseases (Fisher *et al.*, 2005) and is found in different *C. perfringens* toxinotypes (Freedman *et al.*, 2015).

Besides carrying toxin genes, the plasmids harbored by *C. perfringens* also carry genes conferring resistance to antibiotics. The resistance of *C. perfringens* isolates to tetracycline, clindamycin, lincomycin, and erythromycin has been reported in animals (Rood *et al.*, 1985; Slavić *et al.*, 2011). Tetracycline resistance plasmids are the most common antibiotic resistance plasmids in *C. perfringens* (Adams *et al.*, 2018). The genes *tetA(P)* and *tetB(P)* are frequently associated with tetracycline resistance (Johansson *et al.*, 2004; Park and Rafii, 2019) and the genes *erm(B)* or *erm(Q)* have been associated with macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance (Adams *et al.*, 2018; Berryman *et al.*, 1994), the *erm(Q)* gene being the most common erythromycin resistance determinant reported in *C. perfringens*. Only a few studies have examined the antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* isolates collected from agricultural environments. High resistance to tetracycline has been reported in isolates from piglets, chickens or cattle (Johansson *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2010; Salvarani *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2001). Moreover, 63% and 38.4% of *C. perfringens* isolates collected from soil in the United States (Park *et al.*, 2010) and in Greece (Voidarou *et al.*, 2011) were resistant to tetracycline. Soge *et al.* (Soge *et al.*, 2009) also reported that the *tetA(P)* gene was common in isolates in water and soil. Despite the ability of *C. perfringens* to transfer antibiotic resistance *via* bacterial conjugation (Kather *et al.*, 2006) and its ability to survive under conditions found in mesophilic anaerobic digesters (MAD) (Le Maréchal *et al.*, 2019; Lloret *et al.*, 2013b), information is lacking on the antimicrobial susceptibility of resistant *C. perfringens* isolates in digestate intended for land application.

The aims of this study were (i) to identify the toxinotype and the antimicrobial resistance profiles of *C. perfringens* isolates in digestates originating from three agricultural biogas plants and (ii) to compare the profiles with *C. perfringens* isolates in manure collected in the same biogas plants.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Biogas plants and sample collection

Samples were collected from three on-farm biogas plants (BGPs) located in a same area (within a distance of less than 120 km), fed with manure and co-substrates of vegetable origin, the proportion of

which depending on the BGP (Table S1). BGP1 and BGP3 were fed with liquid pig manure. BGP2 manure mainly comprised liquid dairy manure ( $\geq 86\%$ ) and to a lesser extent, solid poultry manure.

Each BGP was sampled eight times (at six-week intervals) from May 2017 to July 2018. Prior to sampling, the liquid manure in the storage tank and in the digester was mixed. At each sampling date, liquid manure and raw digestates were collected using three 10 L buckets for each type of matrix. Samples from each bucket were transferred into 1 L sterile flasks. A total of 48 samples per BGP were analyzed (2 matrices  $\times$  3 replicates  $\times$  8 sampling dates). Moreover, as poultry manure was not systematically present in BGP2, only three samples were collected during the sampling period. Microbiological analyses were performed within 4 h after sampling.

## 2.2. Isolation of *C. perfringens*

Samples (25 g) of manure or digestate were homogenized in 225 mL of peptone water. Tenfold serial dilution of the suspensions was performed. *C. perfringens* was isolated according to the standard ISO method 7937:2005-02 (Anonymous, 2005). Briefly, Tryptone sulfite Cycloresin agar (TSC, Thermo Fisher Scientific, France) was poured into a Petri dish containing 1 mL of each serial dilution. After solidification of the agar, an overlayer of 10 mL of TSC was added. The plates were incubated under anaerobic conditions using anaerobic jars with gaspack (AnaeroGen, Thermo Scientific, France) at 37 °C for 20 h  $\pm$  2 h. Five black colonies were randomly selected on a plate containing between five and 10 colonies of presumptive *C. perfringens* and transferred into thioglycolate broth (Thermo Fisher Scientific, France). The tubes were incubated under anaerobic conditions at 37 °C for 18 h  $\pm$  2 h. Five drops of each thioglycolate culture were transferred into Lactose Sulfite Broth (LS, Biokar Diagnostics, France). After incubation at 46 °C for 18 h  $\pm$  2 h in a water bath, the tubes exhibiting gas production and blackening of the culture medium were considered positive. At each sampling date, all confirmed colonies were purified and suspended in 50% glycerol / 50% Brain Heart Infusion Broth (BHI, Thermo Fisher Scientific, France) before being stored at -80°C. A total of 157 isolates were collected from the three BGPs (Table 1).

**Table 1.** Distribution of the isolates collected from the three BGPs

Matrix	BGP1		BGP2			BGP3	
	Manure	Digestate	Dairy manure	Poultry manure	Digestate	Manure	Digestate
Nb isolates	24	21	25	14	19	29	25

## 2.3. DNA extraction

All isolates were cultured on Wilkins-Chalgren agar (WICH, Thermo Fisher Scientific, France). After incubation at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions, ca. 40 mg of pure culture were removed with a sterile swab and transferred into a 2 mL tube. DNA extractions were performed using the Nucleospin® Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the supplier's recommendations. The DNA was eluted from the silica column in a 100  $\mu$ L elution buffer (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) and then stored at -20 °C. DNA purity and concentration were determined by measuring absorption at 260 and 280 nm using a BioPhotometer Spectrophotometer (Eppendorf, France).

## 2.4. Determination of the toxin genotype and search for antibiotic resistance genes

Real-time PCR targeting the four major toxin genes (*cpa*, *cpb*, *etx* and *iap*), and three minor toxin genes (*cpe*, *netB* and *cpb2*) was carried out to genotype the *C. perfringens* isolates (Table 2). Strain 103009089 from the ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and

Safety) strain collection and strains CIP 103409<sup>T</sup>, CIP 106527, CIP 105568, CIP 106156 and CIP 104612 from the Institut Pasteur Collection were used as positive controls.

Four antibiotic resistance genes that may be carried by *C. perfringens* (*tetA*(P), *tetB*(P), *tet*(M) and *erm*(Q)) were detected by real-time PCR (Table 2). A strain of *C. perfringens* and a strain of *Clostridioides difficile*, kindly provided by Dr. O. Firmesse (Anses, Maisons-Alfort, France) and Dr. F. Barbut (Saint-Antoine Hospital, Paris, France) respectively, were used as positive controls for *tetA*(P), *tetB*(P), and *erm*(Q) genes (*C. perfringens* 175 BCL 67), and for *tet*(M) (*C. difficile* CD17\_412).

Real-time PCRs were performed using a Bio-Rad CFX96 real-time PCR machine with Bio-Rad CFX Manager software, version 1.1 (Bio-Rad, France) in a final volume of 25 µL. The reaction mixture consisted of 12.5 µL of IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, France), a 400 nmol/L concentration of each primer, 2 µL of 1/10 diluted DNA, and 9.5 µL of water. Negative controls without DNA were also prepared. PCR preparation was performed using the epMotion 5070 automated pipetting station (Eppendorf, France).

The Real-time PCR program for the target gene included one cycle at 94 °C for 5 min, 40 cycles at 94 °C for 20 sec, one cycle at 55 °C for 30 sec, and one cycle at 72 °C for 30 sec (Baums *et al.*, 2004; Keyburn *et al.*, 2008). The melting curve of the amplification products was analyzed at the end of each qPCR (temperature range 65 °C to 95 °C). Analysis of the melting curve of the standard replicates yielded only one peak resulting from the specific amplification of the target gene. For a given gene, the amplification of the correct PCR fragment was verified by comparing the cycling threshold value and the melting curve of the standard PCR product with each environmental isolate PCR product.

**Table 2.** Primers used for the detection of *C. perfringens* toxin genes and antimicrobial resistance genes

Gene	Primers	Sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>cpa</i>	CPA5L	AGTCTACGCTTGGGATGGAA	900	(Baums <i>et al.</i> , 2004)
	CPA5R	TTTCCTGGGTTGTCCATTTTC		
<i>cpb</i>	CPBL	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAAA	611	(Baums <i>et al.</i> , 2004)
	CPBR	TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA		
<i>iap</i>	CPIL	AAACGCATTAAAGCTCACACC	293	(Baums <i>et al.</i> , 2004)
	CPIR	CTGCATAACCTGGAATGGCT		
<i>etx</i>	CPETXL	TGGGAACCTTCGATACAAGCA	396	(Baums <i>et al.</i> , 2004)
	CPEXTR	TTAACTCATCTCCCATAACTGCAC		
<i>cpe</i>	CPEL	GGGGAACCCTCAGTAGTTTCA	506	(Baums <i>et al.</i> , 2004)
	CPER	ACCAGCTGGATTTGAGTTTAATG		
<i>cpb2</i>	CPB2L	CAAGCAATTGGGGGAGTTTA	200	(Baums <i>et al.</i> , 2004)

**Table 2 (continued)**

Gene	Primers	Sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
	CPB2R	GCAGAATCAGGATTTTGACCA		
<i>netB</i>	AKP78	GCTGGTGCTGGAATAAATGC	383	(Keyburn <i>et al.</i> , 2008)
	AKP79	TCGCCATTGAGTAGTTTCCC		
<i>erm(Q)</i>	GE 350	GAAGAGTTAAATYACCAACTGA	84	This study
	GE 352	ACTCTCTCTAGGTATTCCCA		
<i>tetA(P)</i>	GE 353	TGTAGCACAGATTGTATGGGGA	124	This study
	GE 355	CCCTGCTTGCTCCCTTTA		
<i>tetB(P)</i>	GE 359	TTTTGGGCGACAGTAGGCTT	90	This study
	GE 361	TGGCAATGACCCTACTGAAACA		
<i>tet(M)</i>	GE 362	GCTATTGCCACAGAGAGAGAGA	127	This study
	GE 364	CGGGTCACTGTCGGAGATT		

### 2.5. Testing antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility was tested on the 138 *cpa*-positive isolates using the commercially available Sensititre™ Bovine/porcine according to the manufacturers' instructions (ThermoFisher Diagnostics, France). Seventeen antimicrobial agents commonly used for the treatment of livestock diseases were tested. They included ( $\mu\text{g/mL}$ ) penicillin (PEN, 0.12-8), ampicillin (AMP, 0.25-16), ceftiofur (TIO, 0.25-8), tartrate tylosin (TYLT, 0.5-32), tulathromycin (TUL, 1-32), tilmicosin (TIL, 4-64), tiamulin (TIA, 0.5-32), chlortetracycline (CTET, 0.5-8), oxytetracycline (OXY, 0.5-8), danofloxacin (DANO, 0.125-1), enrofloxacin (ENRO, 0.125-2), trimethoprim / sulfamethoxazole (SXT, 2/38), sulfadimethoxine (SDM, 256), neomycin (NEO, 4-32) florfenicol (FFN, 0.25-8), spectinomycin (SPE, 8-64), clindamycin (CLI, 0.25-16). The plates contained three wells not inoculated with antibiotics as growth controls. The microplates were sealed with a micro-perforated film and incubated at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions.

Isolates were incubated in WICH broth at 37 °C in under anaerobic conditions. Overnight bacterial cultures were adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard in WICH broth, and 50  $\mu\text{L}$  of the diluted bacterial suspensions (*ca.*  $10^5$  CFU/well) were added to each well.

Among the 138 *cpa*-positive isolates, 14 isolates originated from the three BGP were selected for their high resistance to antibiotics of the Sensititre™ Bovine/porcine plate. Their susceptibility to antimicrobial agents commonly used against anaerobic human pathogens were tested with the Sensititre™ Anaerobe MIC plate (Sensititre™ FRAM1ANA) according to the manufacturers' instructions (ThermoFisher Diagnostics, France). The plate contained 14 antimicrobial agents ( $\mu\text{g/mL}$ ): metronidazole (MRD, 0.5-32), linezolid (LZD, 1-16), moxifloxacin (MXF, 0.12-4), tigecycline (TGC, 1-32), piperacillin-tazobactam constant 4 (P/T4, 2/4-64/4), piperacillin (PIP, 2-64), penicillin (PEN, 0.06-8), vancomycin (VAN, 1-8), amoxicillin (AMOX, 0.25-32) chloramphenicol (CHL, 2-16), amoxicillin / clavulanic acid 2:1 ratio (AUG2, 0.25/0.12-32/16), clindamycin (CLI, 0.5-64), rifampicin (RIF, 1-64), and imipenem (IMI, 0.12-64). The microplates were sealed with a micro-perforated film and incubated at 37 °C for 48 h under anaerobic conditions. The reference strain CIP103 409<sup>T</sup> (Institut Pasteur

Collection, France) was used as control. The antimicrobial profiles obtained on the two Sensititre™ plates are presented in Tables S2 and S3.

The lowest concentration at which no bacterial growth was detected corresponded to the minimum inhibitory concentration (MIC) value. MIC 50 and MIC 90 were the MIC values at which 50% and 90% of the isolates were inhibited.

### 2.6. Statistical analysis

To explore the relationship between the origin of the isolate (BGP, manure, digestate) and their antimicrobial resistance profiles, the MIC of the isolates for the tested antimicrobials was subjected to a principal components analysis (PCA). All statistical tests were performed with XLSTAT 2019 (Addinsoft, France). Heatmap of normalized antimicrobial resistance were generated using the Complex Heat map package in Circlize in R (Gu *et al.*, 2016).

## 3. Results

### 3.1. Toxinotyping of *C. perfringens* isolates

Among the 157 isolates, 138 (88%) carried the *cpa* gene (43 from BGP1, 47 from BGP2 and 48 from BGP3). As shown in Table 3, 108 (78.3%) were type A, and 23 (16.7%) were type G (*netB* gene). Both types were found in pig and dairy manure and in the digestate in all three BGPs. Five isolates (3.6%) and two isolates (1.4%), found only in BGP3, were type C (*cpb* gene) and type D (*etx* gene), respectively. The proportion of *C. perfringens* isolates harboring the *cpb2* gene were 48.1%, 50%, 56.5% and 80% for types A, D, G and C, respectively. None of the isolates harbored both *cpe* and *iap* genes.

**Table 3.** Occurrence of the toxinotypes of *C. perfringens* isolates in manure and digestate in three biogas plants

Type (gene)	BGP1		BGP2		BGP3		Total		
	<i>n</i> (%)		<i>n</i> (%)		<u><i>n</i></u> (%)		<u><i>n</i></u> (%)		
	Manure <i>n</i> =23	Digestate <i>n</i> =20	Dairy manure <i>n</i> =19	Poultry manure <i>n</i> =14	Digestate <u><i>n</i></u> =14	Manure <u><i>n</i></u> =24	Digestate <u><i>n</i></u> =24	Manure <u><i>n</i></u> =80	Digestate <u><i>n</i></u> =58
A ( <i>cpa</i> )	6 (26.1)	3 (15)	15 (78.9)	12 (85.7)	8 (57.1)	6 (25)	6 (25)	39 (67.2)	17(21.3)
A ( <i>cpa</i> + <i>cpb2</i> )	13 (56.5)	15 (75)	2(10.5)	2(14.3)	5 (35.7)	8 (33.3)	7 (29.2)	25 (43.1)	27(33.8)
G ( <i>netB</i> )	2 (8.7)	1 (5)	2(10.5)	-	-	4 (16.7)	1 (4.2)	8 (13.8)	2(2.5)
G ( <i>netB</i> + <i>cpb2</i> )	2 (8.7)	1 (5)	-	-	1 (7.1)	3 (12.5)	6 (25)	5 (8.6)	8(10)
C ( <i>cpb</i> )	- <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	1 (4.2)	-	1 (1.3)
C ( <i>cpb</i> + <i>cpb2</i> )	-	-	-	-	-	1 (4.2)	3 (12.5)	1 (1.7)	3(3.8)
D ( <i>etx</i> )	-	-	-	-	-	1 (4.2)	-	1 (1.7)	-
D ( <i>etx</i> + <i>cpb2</i> )	-	-	-	-	-	1 (4.2)	-	1 (1.7)	-

<sup>1</sup> not detected



### 3.2. Tetracycline and erythromycin resistance genes of *C. perfringens* isolates

Both *tetA*(P) and *tetB*(P) genes were detected in the 138 *cpa*-positives isolates from manure and digestate of the three BGPs, but not in isolates from poultry manure (Table 4), whereas the *erm*(Q) gene was only found in isolates from BGP1 and BGP3.

**Table 4.** Detection of antimicrobial resistance genes (*tetA*(P), *tetB*(P), *tet*(M), and *erm*(Q) genes) of isolates in manure and digestate in three biogas plants

gene	BGP1		BGP2		BGP3		Total		
	<i>n</i> (%)		<i>n</i> (%)		<i>n</i> (%)		<i>n</i> (%)		
	Manure <i>n</i> =23	Digestate <i>n</i> =20	Dairy manure <i>n</i> =19	Poultry manure <i>n</i> =14	Digestate <i>n</i> =14	Manure <i>n</i> =24	Digestate <i>n</i> =24	Manure <i>n</i> =80	Digestate <i>n</i> =58
<i>tetA</i> (P)	12 (52.2)	13 (65)	2(10.5)	-	2 (14.3)	10 (41.7)	5 (20.8)	24 (30)	20 (34.5)
<i>tetA</i> (P) + <i>tetB</i> (P)	9 (39.2)	6 (30)	10 (52.6)	-	8 (57.1)	5 (20.8)	10 (41.7)	24 (30)	24 (41.4)
<i>tetA</i> (P) + <i>erm</i> (Q)	1 (4.3)	-	-	-	-	-	1 (4.2)	1 (1.25)	1 (1.7)
<i>tetB</i> (P) + <i>erm</i> (Q)	<sup>1</sup>	-	-	-	-	1 (4.2)	-	1 (1.25)	-
<i>tetA</i> (P) + <i>tetB</i> (P) + <i>erm</i> (Q)	1 (4.3)	1 (5)	-	-	-	-	4 (16.7)	1 (1.25)	5 (8.6)
<i>tet</i> (M)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
no ARG <sup>2</sup>	-	-	7 (36.8)	14 (100)	4(28.6)	8 (33.3)	4(16.7)	29 (36.3)	8(13.8)

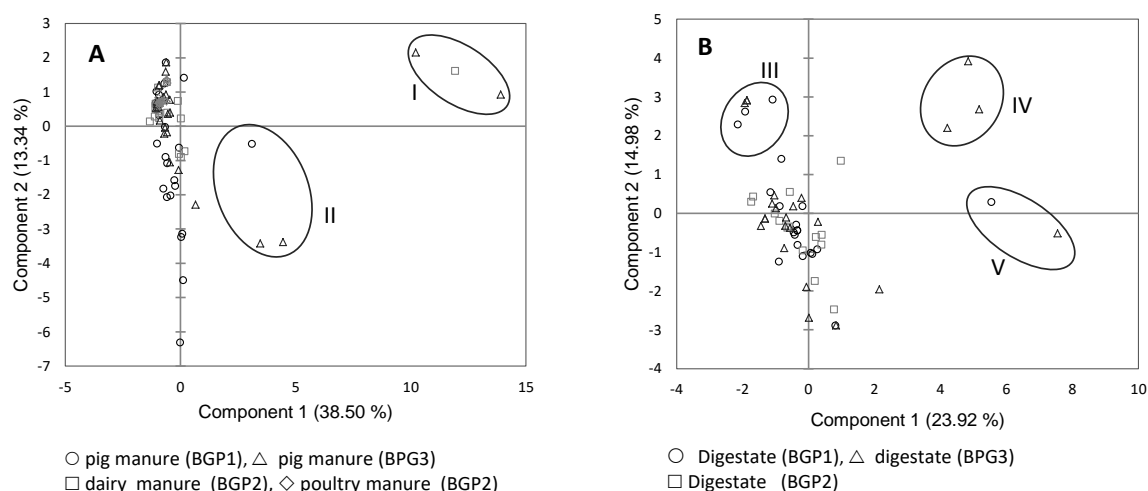
<sup>1</sup> not detected; <sup>2</sup> no detection of the four genes

The most frequent gene, *tetA*(P), was found in 62.5% and 86.2% of the isolates from the manure and digestate in the three BGPs, respectively. The *tetB*(P) gene was associated with *tetA*(P) genes in 31.3% and 50% of the isolates from manure and digestate, respectively. The *erm*(Q) gene was found less frequently, *i.e.* in 3.8% of the isolates from manure and 10.3% of the isolates from digestate. No *tet*(M) gene was detected in the isolates.

### 3.3. Antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* isolates

The 138 *cpa*-positive isolates were subjected to antimicrobial resistance analysis using the Sensititre™ bovine/porcine test system. Plots of the first and second PCA scores revealed no differences between the antimicrobial resistance profiles of the isolates originating from the manure (Figure 1A) and from the digestates (Figure 1B) of the three BGPs. However, 17 isolates originating from the three BGPs, that we clustered in five groups (I and II, Figure 1A; III to V, Figure 1B) differed from the other isolates by their high resistance to some of the antibiotics tested (Figure S1). Isolates from Group I (*n*=3) differed by their high level of resistance to penicillin (MIC > 8 µg/mL), ampicillin and clindamycin (MIC ≥ 16 µg/mL), tartrate tylosin and tiamulin (MIC > 32 µg/mL) and tilmicosin (MIC > 64 µg/mL). Isolates from Group II (*n*=3) were highly resistant to clindamycin (MIC ≥ 16 µg/mL), tilmicosin (MIC > 64 µg/mL) and oxytetracycline (MIC > 8 µg/mL). Isolates from Group III (*n*=6) had a higher MIC for enrofloxacin and danofloxacin than the maximum concentration tested (MIC

> 2 µg/mL and > 1 µg/mL, respectively). Isolates from Group IV (n=3) were highly resistant to both clindamycin (MIC ≥ 16 µg/mL) and tilmicosin (MIC > 64 µg/mL). Isolates from Group V (n=2) were highly resistant to oxytetracycline (MIC > 8 µg/mL), clindamycin (MIC > 16 µg/mL) and tilmicosin (> 64 µg/mL).



**Figure 1.** PCA analysis of antimicrobial resistance profiles of *C. perfringens* isolates from manure (A) and digestate (B) in three BPGs. Groups I to V contained highly resistant isolates.

The antimicrobial resistance profiles of the isolates varied considerably in the biogas plants, regardless of their origin (manure or digestate) (Figure S1). However, the MIC distribution of isolates from manure was close to that of isolates from digestate (Table 5, Figure S2).

**Table 5.** MIC distribution (µg/mL) of 13 antimicrobials tested against 138 isolates of *C. perfringens* originating from three BPGs

	Antimicrobial agents	Origin of isolates							
		Manure (n=80)				Digestate (n=58)			
		MIC50	MIC90	Min	Max	MIC50	MIC90	Min	Max
β-lactams	Penicillin	≤0.125	1	≤0.125	>8	≤0.125	0.5	≤0.125	1
	Ampicillin	≤0.25	≤0.25	≤0.25	>16	≤0.25	≤0.25	≤0.25	2
	Ceftiofur	≤0.25	1	≤0.25	4	≤0.25	2	≤0.25	2
Macrolides	Tartrate Tylosin	≤0.5	4	≤0.5	>32	≤0.5	8	≤0.5	16
	Tilmicosin	≤4	8	≤4	>64	≤4	≤4	≤4	>64
	Tulathromycin	64	>64	16	>64	64	>64	32	>64
Lincosamides	Clindamycin	2	2	≤0.25	>16	2	4	≤0.25	>16
Fluoroquinolones	Enrofloxacin	0.25	>2	0.25	>2	0.50	>2	≤0.125	>2
	Danofloxacin	1	>1	0.25	>1	1	>1	0.5	>1
Pleuromutilins	Tiamulin	4	8	≤0.5	>32	4	16	≤0.5	>32
Phenicols	Florfenicol	1	2	0.5	>8	1	1	≤0.25	2
Tetracyclines	Chlortetracycline	≤0.5	8	≤0.5	>8	1	4	≤0.5	8
	Oxytetracycline	2	>8	≤0.5	>8	8	>8	≤0.5	>8

With the exception of tulathromycin, the MICs of the isolates covered the dilution range tested for all antimicrobials (Table 5). Most of the isolates were susceptible to  $\beta$ -lactam and macrolides, except tulathromycin (with a MIC 50 value of 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Enrofloxacin and danofloxacin had low MIC 50 values of 0.25-0.5 and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Most of the isolates exhibited sensitivity to chlortetracycline with a MIC 50 value of  $\leq 0.50$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  in manure and of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in digestate. The MIC 50 values of oxytetracycline were higher (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in manure and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in digestate).

Moreover, the growth of 19% of *C. perfringens* isolates was inhibited by sulfadimethoxine (Figure S1). Among the highly resistant group I to V, 14 isolates were tested on microplates containing antibiotics used in human medicine (Table S3). Five of the tested isolates present in BGP2 and BGP3, showed high resistance to human antibiotics including imipenem, linezolid, amoxicillin-clavulanate, chloramphenicol, moxifloxacin, tigecycline, and vancomycin.

#### 4. Discussion

Although digestates from biogas plants fed with manure contain high levels of *C. perfringens* (ca.  $10^4$  CFU/g) (Le Maréchal *et al.*, 2019; Orzi *et al.*, 2015), no information is available on the range of toxin genes and the antimicrobial profiles of this pathogenic bacterium in agricultural digestate intended for land application. This is the first study to assess digestate as a potential carrier of virulent and multiresistant *C. perfringens*.

##### 4.1. Toxinotyping of *C. perfringens* isolates

The dominance of type A isolates in both manure and digestate is in agreement with the high prevalence of this toxinotype in farm animals (Fohler *et al.*, 2016b; Ngamwongsatit *et al.*, 2016; T. Zhang *et al.*, 2018). Although the *cpe* gene was not detected in either manure or digestate, the three BGPs produced digestate containing virulent *C. perfringens*. Indeed, half the type A isolates from the three BGPs carried the *cpb2* gene encoding the  $\beta_2$  toxin, which is reported to be associated with diarrheal diseases (Freedman *et al.*, 2016; Uzal *et al.*, 2018). This result is consistent with those of studies conducted on farm animals in which between 39% and 78.8% frequency of the *cpa* gene together with *cpb2* gene was observed (Hashimoto *et al.*, 2016; Park and Rafii, 2019; Yadav *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Moreover, some isolates recovered from manure and digestate were positive for *cpb*, *etx*, and *netB* genes. Conversely, Chan *et al.* (Chan *et al.*, 2012) did not detect these genes in fecal and manure samples collected from pig farms. Type C (*cpa* + *cpb* genes) and type D (*cpa* + *etx* genes), both associated with farm animal diseases, were detected at a low frequencies only in isolates from the BGP3 digestate. Type G (*cpa* and *netB* genes), responsible for necrotic enteritis in chickens (Chan *et al.*, 2012; Leclercq *et al.*, 2016; Salvarani *et al.*, 2012), was carried by isolates from all three BGPs, showing that land application of digestate can contribute to the dissemination of *C. perfringens* carrying *netB* in the agricultural environment.

##### 4.2. Tetracycline and erythromycin resistance genes of *C. perfringens* isolates

The occurrence of resistance genes and the antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* of environmental origin have rarely been studied. In this study, although the *tet(M)* gene was not detected in digestate, the *tetA(P)* gene alone and double resistance *tetA(P)-tetB(P)* genes were found in 34.5% and 41.4% of the isolates, respectively. Their prevalence in digestates was slightly higher than that reported in other matrices. Indeed, Kiu *et al.* (Kiu *et al.*, 2019) observed a frequency of detection of *tetA(P)* alone and of the *tetA(P)-tetB(P)* gene of 14.8% and 35.2% in isolates from broiler chickens, respectively. In another study, they were detected in 26% and 22% of isolates of environmental origin (soils, water and sewage) (Soge *et al.*, 2009). The proportion of isolates carrying the *erm(Q)* gene (13.6%) in the digestates of the two BGPs fed with pig manure was also higher than that observed previously in isolates collected from broiler chickens (4.5%) and in environmental samples (1%) (Kiu *et al.*, 2019; Soge *et al.*, 2009).

#### 4.3. Antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* isolates

In addition to their natural resistance to aminoglycosides, *C. perfringens* showed significant resistance to tetracycline, which has been associated with the presence of *tetA(P)*, *tetB(P)* and *tet(M)* genes (Sasaki *et al.*, 2001). In this study, the isolates were more resistant to oxytetracycline than to chlortetracycline (Table 5), in agreement with the studies of Martel *et al.* (Martel *et al.*, 2004) and Ngamwongsatit *et al.* (Ngamwongsatit *et al.*, 2016) who reported that chlortetracycline was more active than oxytetracycline against *C. perfringens* isolated from chickens and from neonatal piglets, respectively. It is noteworthy that 7.4% of the isolates with a MIC  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  for chlortetracycline and with a MIC  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  for oxytetracycline harbored none of the three target genes (*tetA(P)*, *tetB(P)*, and *tet(M)*). This could be explained by the presence of other tetracycline resistance genes. Indeed, *tet(K)* and *tet(L)* have been detected at low frequencies in isolates from broilers (Gholamiandehkordi *et al.*, 2009; Martel *et al.*, 2004). Moreover, 4.4% of the isolates that were susceptible to both chlortetracycline and oxytetracycline (MIC  $\leq 0.5$   $\mu\text{g/mL}$ ) carried the *tetA(P)-tetB(P)* genes and 22.2% carried the *tetA(P)* gene. The inconsistency between the MIC values and the presence of genetic tetracycline resistance determinants has already been pointed out (Gholamiandehkordi *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2004; Kather *et al.*, 2006). The reason for the presence of sensitive isolates harboring *tetA(P)* and/or *tetB(P)* is unclear. As suggested by Kather *et al.* (Kather *et al.*, 2006) and Gholamiandehkordi *et al.* (Gholamiandehkordi *et al.*, 2009), this may be due to lack of expression or to point mutation. In the present study, all strains were highly resistant to tulathromycin, a macrolide antibiotic used to treat bovine and swine respiratory diseases (Villarino *et al.*, 2013). However, it was not possible to determine the antibiotic usage in the three farms whose manure was treated by anaerobic digestion. On the whole, the MIC 50 observed in manure and digestates for the antibiotic tested resembled those reported in animal feces (Llanco *et al.*, 2012; Ngamwongsatit *et al.*, 2016; Oliveira Júnior *et al.*, 2016; Salvarani *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2001; Slavić *et al.*, 2011), suggesting that storing manure and anaerobic digestion have no impact on the antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* originating from farm animals.

Among the *C. perfringens* isolates from the three BGPs, 12.3% were highly resistant to some of the antibiotics tested. Five of the 14 isolates tested with the Sensititre™ Anaerobe MIC plate (four from BGP3, one from BGP2), were also highly resistant to human antimicrobial medicine (Table S3). Based on the values of the EUCAST anaerobe MIC breakpoints reported by Pence *et al.* (Pence, 2019), these isolates were resistant to metronidazole, clindamycin and penicillin (MIC  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ), to chloramphenicol, amoxicillin-clavulanate and imipenem (MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ ), and to piperacillin-tazobactam (MIC  $> 64$   $\mu\text{g/mL}$ ). High MIC were also observed for vancomycin (MIC  $> 8$   $\mu\text{g/mL}$ ), which is normally low for *Clostridia*, and for moxifloxacin (MIC  $> 4$   $\mu\text{g/mL}$ ), the resistance to which is reported to be increasing (Pence, 2019).

In this study, digestates were collected from digesters fed with manure, which is the first step of the process of anaerobic digestion. Indeed, post-treatments of raw digestates involved either storage in a tank, post-digestion (BGP2), or mechanical separation of the solid fraction before composting and storage of the liquid fraction (BGP1). It has been reported that post-digestion and mechanical separation do not reduce the concentration of *C. perfringens* (Orzi *et al.*, 2015) contrary to manure composting (Gómez-Brandón *et al.*, 2016; Tien *et al.*, 2017). Moreover the legally requirement for heat treatment (70 °C for 1 hour) according to the EU animal by-products regulation (EU Commission Regulation (EU) No 142/2011), is not sufficient to eliminate spores of *C. perfringens*. Indeed, Sahlström *et al.* (Sahlström *et al.*, 2008) reported that the number of *C. perfringens* was not significantly affected by this time-temperature condition. On the opposite, high temperatures (135°C to 190°C) pre-treatments performed in order to increase accessibility of the enzymes to the substrate and therefore to enhance biogas production (Carrere *et al.*, 2016; Carrère *et al.*, 2009), may reduce the concentration of *C. perfringens*. Actually, inactivation of *C. perfringens* spores can be achieved at temperatures of 110°C (Talukdar *et al.*, 2017). High temperature pre-treatment or digestate composting may be thus applied to avoid *C. perfringens* spreading in soils.

## 5. Conclusions

The results of this study revealed that both manure and digestates contained *C. perfringens* isolates belonging types C, D and G, which may be pathogenic for human or animals. Moreover, the presence in the digestates of some isolates highly resistant to antibiotics used both in veterinary and human medicine may increase the burden of antimicrobial resistance in agroecosystems, as *C. perfringens* could be involved in horizontal gene transfer from enteric bacteria to bacterial soil populations.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: Heatmap of antimicrobial resistance profiles of *C. perfringens* isolates from three biogas plants, Figure S2: MIC distribution of 13 antimicrobials in manure and raw digestate in three BGPs., Table S1: Process parameters of the three biogas plants., Table S2: MIC of *C. perfringens* CIP 103409<sup>T</sup> obtained on Sensititre™ Bovine/porcine (µg/mL)., Table S3: MIC of selection of isolates (belonging to groups I to V) from the three BGP and of the reference strain CIP 103409<sup>T</sup> obtained on Senti titre™ FRAM1ANA (µg/mL).

**Author Contributions:** Author contributions were as follows: AM.P and L.D: conceptualization, methodology, validation, formal analysis; CZ and LD: performing the experiments; All authors: resources; L.D: writing—Original draft preparation; AM.P, C.D and C.LM: writing—Review and editing, supervision, funding acquisition; AM.P and C.D: project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), grant number 1606C0022

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the participating farmers. The authors also thank Dr. Olivier Firmesse and Dr. Frédéric Barbut for the reference strains. L.D. is recipient of an Irstea-Région Bretagne fellowship.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## 6. References

1. European Biogas Association. Annual Statistical Report; 2019;
2. Johansson, A.; Aspan, A.; Bagge, E.; Båverud, V.; Engström, B.E.; Johansson, K.-E. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol* 2006, 6, 47, doi:10.1186/1471-2180-6-47.
3. Gómez-Brandón, M.; Juárez, M.F.-D.; Zangerle, M.; Insam, H. Effects of digestate on soil chemical and microbiological properties: A comparative study with compost and vermicompost. *Journal of Hazardous Materials* 2016, 302, 267–274, doi:10.1016/j.jhazmat.2015.09.067.
4. Lau, C.H.-F.; Li, B.; Zhang, T.; Tien, Y.-C.; Scott, A.; Murray, R.; Sabourin, L.; Lapen, D.R.; Duenk, P.; Topp, E. Impact of pre-application treatment on municipal sludge composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of The Total Environment* 2017, 587–588, 214–222, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.123.
5. Scott, A.; Tien, Y.-C.; Drury, C.F.; Reynolds, W.D.; Topp, E. Enrichment of antibiotic resistance genes in soil receiving composts derived from swine manure, yard wastes, or food wastes, and evidence for multiyear persistence of swine *Clostridium* spp. *Can. J. Microbiol.* 2018, 64, 201–208, doi:10.1139/cjm-2017-0642.
6. Leclercq, S.O.; Wang, C.; Sui, Z.; Wu, H.; Zhu, B.; Deng, Y.; Feng, J. A multiplayer game: species of *Clostridium*, *Acinetobacter*, and *Pseudomonas* are responsible for the persistence of antibiotic resistance genes in manure-treated soils: Antibiotic resistance genes in manure-treated soils. *Environmental Microbiology* 2016, 18, 3494–3508, doi:10.1111/1462-2920.13337.
7. Kather, E.J.; Marks, S.L.; Foley, J.E. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 2006, 113, 97–101, doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.021.

8. Soge, O.O.; Tivoli, L.D.; Meschke, J.S.; Roberts, M.C. A conjugative macrolide resistance gene, *mef(A)*, in environmental *Clostridium perfringens* carrying multiple macrolide and/or tetracycline resistance genes. *Journal of Applied Microbiology* 2009, 106, 34–40, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03960.x.
9. Alegbeleye, O.O.; Sant'Ana, A.S. Manure-borne pathogens as an important source of water contamination: An update on the dynamics of pathogen survival/transport as well as practical risk mitigation strategies. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2020, 227, 113524, doi:10.1016/j.ijheh.2020.113524.
10. Nag, R.; Auer, A.; Markey, B.K.; Whyte, P.; Nolan, S.; O'Flaherty, V.; Russell, L.; Bolton, D.; Fenton, O.; Richards, K.; *et al.* Anaerobic digestion of agricultural manure and biomass – Critical indicators of risk and knowledge gaps. *Science of The Total Environment* 2019, 690, 460–479, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.512.
11. Hamza, D.; Dorgham, S.M.; Elhariri, M.; Elhelw, R.; Ismael, E. New insight of apparently healthy animals as a potential reservoir for *Clostridium perfringens*: a public health implication. *Journal of Veterinary Research* 2018, 62, 457–462, doi:10.2478/jvetres-2018-0073.
12. Tango, C.N.; Wei, S.; Khan, I.; Hussain, M.S.; Kounkeu, P.-F.N.; Park, J.; Kim, S.; Oh, D.H. Microbiological Quality and Safety of Fresh Fruits and Vegetables at Retail Levels in Korea. *Journal of Food Science* 2018, 83, 386–392, doi:10.1111/1750-3841.13992.
13. Pence, M.A. Antimicrobial Resistance in Clinically Important Anaerobes. *Clinical Microbiology Newsletter* 2019, 41, 1–7, doi:10.1016/j.clinmicnews.2018.12.003.
14. Kiu, R.; Brown, J.; Bedwell, H.; Leclaire, C.; Caim, S.; Pickard, D.; Dougan, G.; Dixon, R.A.; Hall, L.J. Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis. *anim microbiome* 2019, 1, 12, doi:10.1186/s42523-019-0015-1.
15. Rood, J.I.; Adams, V.; Lacey, J.; Lyras, D.; McClane, B.A.; Melville, S.B.; Moore, R.J.; Popoff, M.R.; Sarker, M.R.; Songer, J.G.; *et al.* Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 2018, 53, 5–10, doi:10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.
16. Centers for Disease Control and Prevention, (CDC) Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2017; CDC: Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, 2019; p. 10;.
17. Anonymous Santé publique France / Le point épidémiologique / Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2018. 2019, 12.
18. Freedman, J.C.; Theoret, J.R.; Wisniewski, J.A.; Uzal, F.A.; Rood, J.I.; McClane, B.A. *Clostridium perfringens* type A–E toxin plasmids. *Research in Microbiology* 2015, 166, 264–279, doi:10.1016/j.resmic.2014.09.004.
19. Uzal, F.A.; Navarro, M.A.; Li, J.; Freedman, J.C.; Shrestha, A.; McClane, B.A. Comparative pathogenesis of enteric *Clostridial* infections in humans and animals. *Anaerobe* 2018, 53, 11–20, doi:10.1016/j.anaerobe.2018.06.002.
20. Fisher, D.J.; Miyamoto, K.; Harrison, B.; Akimoto, S.; Sarker, M.R.; McClane, B.A. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene: *cpb2* / *cpe* -positive *C. perfringens* disease isolates. *Molecular Microbiology* 2005, 56, 747–762, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04573.x.
21. Rood, J.I.; Buddle, J.R.; Wales, A.J.; Sidhu, R. The occurrence of antibiotic resistance in *Clostridium perfringens* from pigs. *Australian Veterinary Journal* 1985, 62, 276–279, doi:10.1111/j.1751-0813.1985.tb14251.x.

22. Slavić, Đ.; Boerlin, P.; Fabri, M.; Klotins, K.C.; Zoethout, J.K.; Weir, P.E.; Bateman, D. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J Vet Res* 2011, 75, 89–97.
23. Adams, V.; Han, X.; Lyras, D.; Rood, J.I. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid* 2018, 99, 32–39, doi:10.1016/j.plasmid.2018.07.002.
24. Johansson, A.; Greko, C.; Engström, B.E.; Karlsson, M. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology* 2004, 99, 251–257, doi:10.1016/j.vetmic.2004.01.009.
25. Park, M.; Rafii, F. The prevalence of plasmid-coded cpe enterotoxin,  $\beta$ 2 toxin, tpeL toxin, and tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains isolated from different sources. *Anaerobe* 2019, 56, 124–129, doi:10.1016/j.anaerobe.2019.02.007.
26. Berryman, D.I.; Lyrstis, M.; Rood, J.I. Cloning and sequence analysis of *ermQ*, the predominant macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38, 1041–1046, doi:10.1128/AAC.38.5.1041.
27. Sasaki, Y.; Yamamoto, K.; Tamura, Y.; Takahashi, T. Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema. *Veterinary microbiology* 2001, 83, 61–69.
28. Park, M.; Rooney, A.P.; Hecht, D.W.; Li, J.; McClane, B.A.; Nayak, R.; Paine, D.D.; Rafii, F. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and minocycline resistance in *Clostridium perfringens*. *Archives of Microbiology* 2010, 192, 803–810, doi:10.1007/s00203-010-0605-5.
29. Salvarani, F.M.; Silva, R.O.S.; Pires, P.S.; Cruz Júnior, E.C. da C.; Albefaro, I.S.; Guedes, R.M. de C.; Lobato, F.C.F. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from piglets with or without diarrhea in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2012, 43, 1030–1033, doi:10.1590/S1517-83822012000300027.
30. Voidarou, C.; Bezirtzoglou, E.; Alexopoulos, A.; Plessas, S.; Stefanis, C.; Papadopoulos, I.; Vavias, S.; Stavropoulou, E.; Fotou, K.; Tzora, A.; *et al.* Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soils. *Anaerobe* 2011, 17, 320–324, doi:10.1016/j.anaerobe.2011.05.004.
31. Lloret, E.; Salar, M.J.; Blaya, J.; Pascual, J.A. Two-stage mesophilic anaerobic–thermophilic digestion for sludge sanitation to obtain advanced treated sludge. *Chemical Engineering Journal* 2013, 230, 59–63, doi:10.1016/j.cej.2013.06.066.
32. Le Maréchal, C.; Druilhe, C.; Repérant, E.; Boscher, E.; Rouxel, S.; Le Roux, S.; Poëzévara, T.; Ziebal, C.; Houdayer, C.; Nagard, B.; *et al.* Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants. *MicrobiologyOpen* 2019, 8, doi:10.1002/mbo3.872.
33. Anonymous ISO 7937: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-Count Technique. Geneva, Switzerland: International Standard Organization. 2005.
34. Keyburn, A.L.; Boyce, J.D.; Vaz, P.; Bannam, T.L.; Ford, M.E.; Parker, D.; Di Rubbo, A.; Rood, J.I.; Moore, R.J. NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens* 2008, 4, e26, doi:10.1371/journal.ppat.0040026.
35. Baums, C.G.; Schotte, U.; Amtsberg, G.; Goethe, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 2004, 100, 11–16, doi:10.1016/S0378-1135(03)00126-3.
36. Gu, Z.; Eils, R.; Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 2016, 32, 2847–2849, doi:10.1093/bioinformatics/btw313.

37. Orzi, V.; Scaglia, B.; Lonati, S.; Riva, C.; Boccasile, G.; Alborali, G.L.; Adani, F. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Science of The Total Environment* 2015, 526, 116–126, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.038.
38. Ngamwongsatit, B.; Tanomsridachchai, W.; Suthienkul, O.; Urairong, S.; Navasakuljinda, W.; Janvilisri, T. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. *Anaerobe* 2016, 38, 88–93, doi:10.1016/j.anaerobe.2015.12.012.
39. Fohler, S.; Klein, G.; Hoedemaker, M.; Scheu, T.; Seyboldt, C.; Campe, A.; Jensen, K.C.; Abdulmawjood, A. Diversity of *Clostridium perfringens* toxin-genotypes from dairy farms. *BMC Microbiology* 2016, 16, doi:10.1186/s12866-016-0812-6.
40. Zhang, T.; Zhang, W.; Ai, D.; Zhang, R.; Lu, Q.; Luo, Q.; Shao, H. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and retail chicken meat in central China. *Anaerobe* 2018, 54, 100–103, doi:10.1016/j.anaerobe.2018.08.007.
41. Freedman, J.; Shrestha, A.; McClane, B. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins* 2016, 8, 73, doi:10.3390/toxins8030073.
42. Hashimoto, A.; Tsuchioka, H.; Higashi, K.; Ota, N.; Harada, H. Distribution of Enterotoxin Gene-positive *Clostridium perfringens* Spores among Human and Livestock Samples and its Potential as a Human Fecal Source Tracking Indicator. *J. of Wat. & Envir. Tech.* 2016, 14, 447–454, doi:10.2965/jwet.16-022.
43. Yadav, J.P.; Das, S.C.; Dhaka, P.; Vijay, D.; Kumar, M.; Mukhopadhyay, A.K.; Chowdhury, G.; Chauhan, P.; Singh, R.; Dhama, K.; et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* type A isolates from humans, animals, fish and their environment. *Anaerobe* 2017, 47, 120–124, doi:10.1016/j.anaerobe.2017.05.009.
44. Yang, W.-Y.; Chou, C.-H.; Wang, C. Characterization of toxin genes and quantitative analysis of *netB* in necrotic enteritis (NE)-producing and non-NE-producing *Clostridium perfringens* isolated from chickens. *Anaerobe* 2018, 54, 115–120, doi:10.1016/j.anaerobe.2018.08.010.
45. Chan, G.; Farzan, A.; Soltes, G.; Nicholson, V.M.; Pei, Y.; Friendship, R.; Prescott, J.F. The epidemiology of *Clostridium perfringens* type A on Ontario swine farms, with special reference to *cpb2*-positive isolates. *BMC Vet Res* 2012, 8, 156, doi:10.1186/1746-6148-8-156.
46. Martel, A.; A. Devriese, L.; Cauwerts, K.; De Gussem, K.; Decostere, A.; Haesebrouck, F. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathology* 2004, 33, 3–7, doi:10.1080/0307945031000163291.
47. Gholamiandehkordi, A.; Eeckhaut, V.; Lanckriet, A.; Timbermont, L.; Bjerrum, L.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F.; Van Immerseel, F. Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium. *Vet Res Commun* 2009, 33, 1031–1037, doi:10.1007/s11259-009-9306-4.
48. Villarino, N.; Brown, S.A.; Martín-Jiménez, T. The role of the macrolide tulathromycin in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 2013, 198, 352–357, doi:10.1016/j.tvjl.2013.07.032.
49. Llanco, L.; Nakano, V.; Ajj, F.; Mj, A.-C. Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens with necrotic enteritis. *Int J of Micr Res* 2012, 4, 290–294, doi:10.9735/0975-5276.4.7.290-294.
50. Oliveira Júnior, C.A.D.; Silva, R.O.S.; Diniz, A.N.; Pires, P.S.; Salvarani, F.M.; Assis, R.A. de; Lobato, F.C.F. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from domestic and wild animal species in Brazil. *Sem. Ci. Agr.* 2016, 37, 257, doi:10.5433/1679-0359.2016v37n1p257.
51. Tien, Y.-C.; Li, B.; Zhang, T.; Scott, A.; Murray, R.; Sabourin, L.; Marti, R.; Topp, E. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and



abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of The Total Environment* 2017, 581–582, 32–39, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.12.138.

52. Sahlström, L.; Bagge, E.; Emmoth, E.; Holmqvist, A.; Danielsson-Tham, M.-L.; Albiñ, A. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technology* 2008, 99, 7859–7865, doi:10.1016/j.biortech.2007.09.071.

53. Carrere, H.; Antonopoulou, G.; Affes, R.; Passos, F.; Battimelli, A.; Lyberatos, G.; Ferrer, I. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. *Bioresource Technology* 2016, 199, 386–397, doi:10.1016/j.biortech.2015.09.007.

54. Carrère, H.; Sialve, B.; Bernet, N. Improving pig manure conversion into biogas by thermal and thermo-chemical pretreatments. *Bioresource Technology* 2009, 100, 3690–3694, doi:10.1016/j.biortech.2009.01.015.

55. Talukdar, P.K.; Udompijtkul, P.; Hossain, A.; Sarker, M.R. Inactivation Strategies for *Clostridium perfringens* Spores and Vegetative Cells. *Appl Environ Microbiol* 2017, 83, e02731-16, e02731-16, doi:10.1128/AEM.02731-16.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary data

Characterization of *Clostridium perfringens* isolates collected from three agricultural biogas plants over a one year period.

Lorine Derongs, Céline Druilhe, Christine Ziebal, Caroline Le Maréchal, Anne-Marie Pourcher

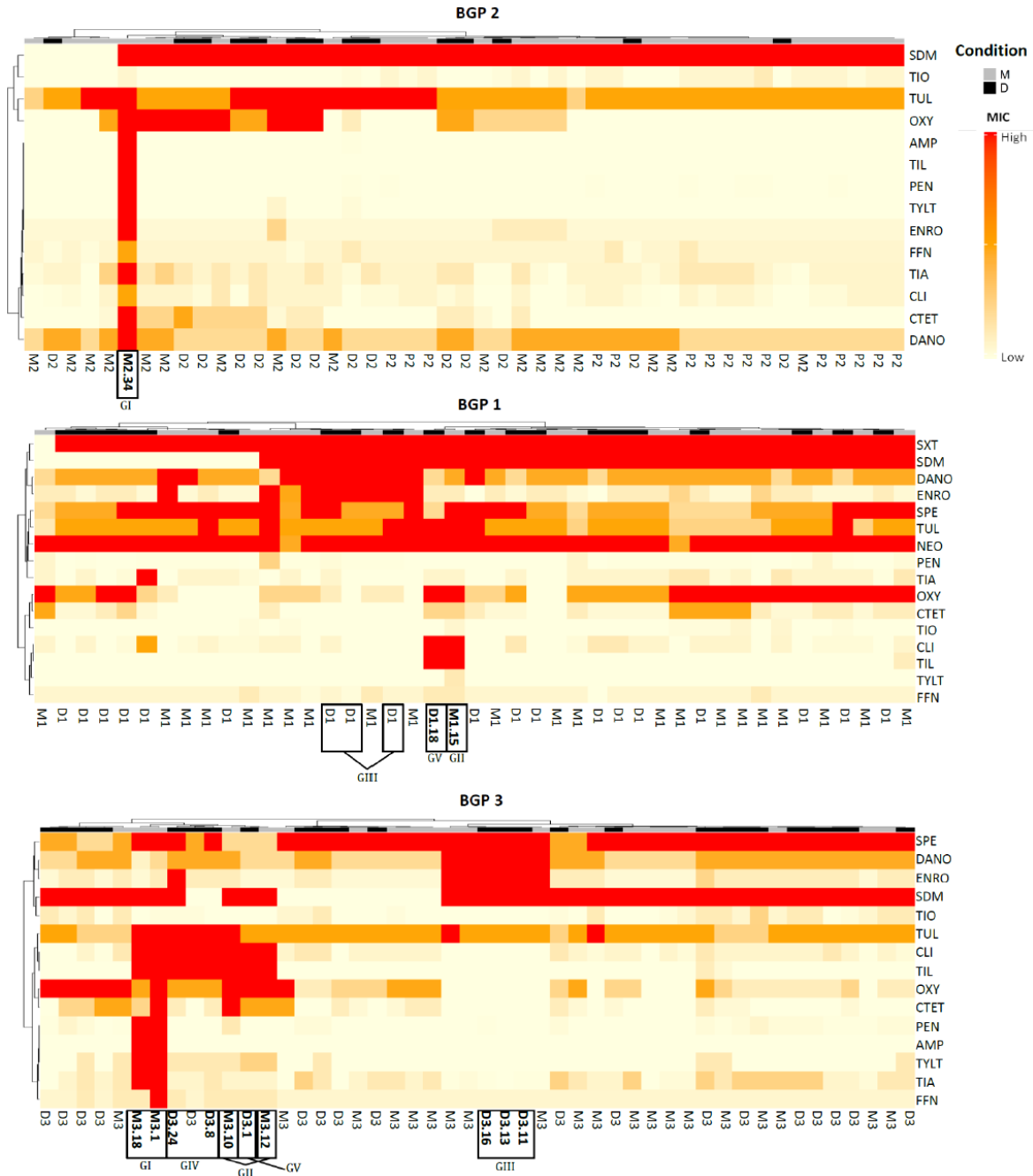


Figure S1 : Heatmap of antimicrobial resistance profiles of *C. perfringens* isolates from three biogas plants (BGP1, BGP2, BGP3). Isolates from pig and dairy manure (M), poultry manure (P) and raw digestates (D). The numbered isolates correspond to isolates that were highly resistant to the antibiotics tested. GI to GV correspond to the groups shown in Figure 2. PEN: penicillin, AMP: ampicillin, TIO : ceftiofur, TYLT: tartrate tylosin, TUL: tulathromycin, TIL: tilmosin, TIA: tiamulin, CTET: chlortetracycline, OXY: oxytetracycline, DANO: danofloxacin, ENRO: enrofloxacin, SXT: trimethoprim / sulfamethoxazole, SDM sulfadimethoxine, NEO: neomycin FFN: florfenicol, SPE: spectinomycin, CLI: clindamycin.

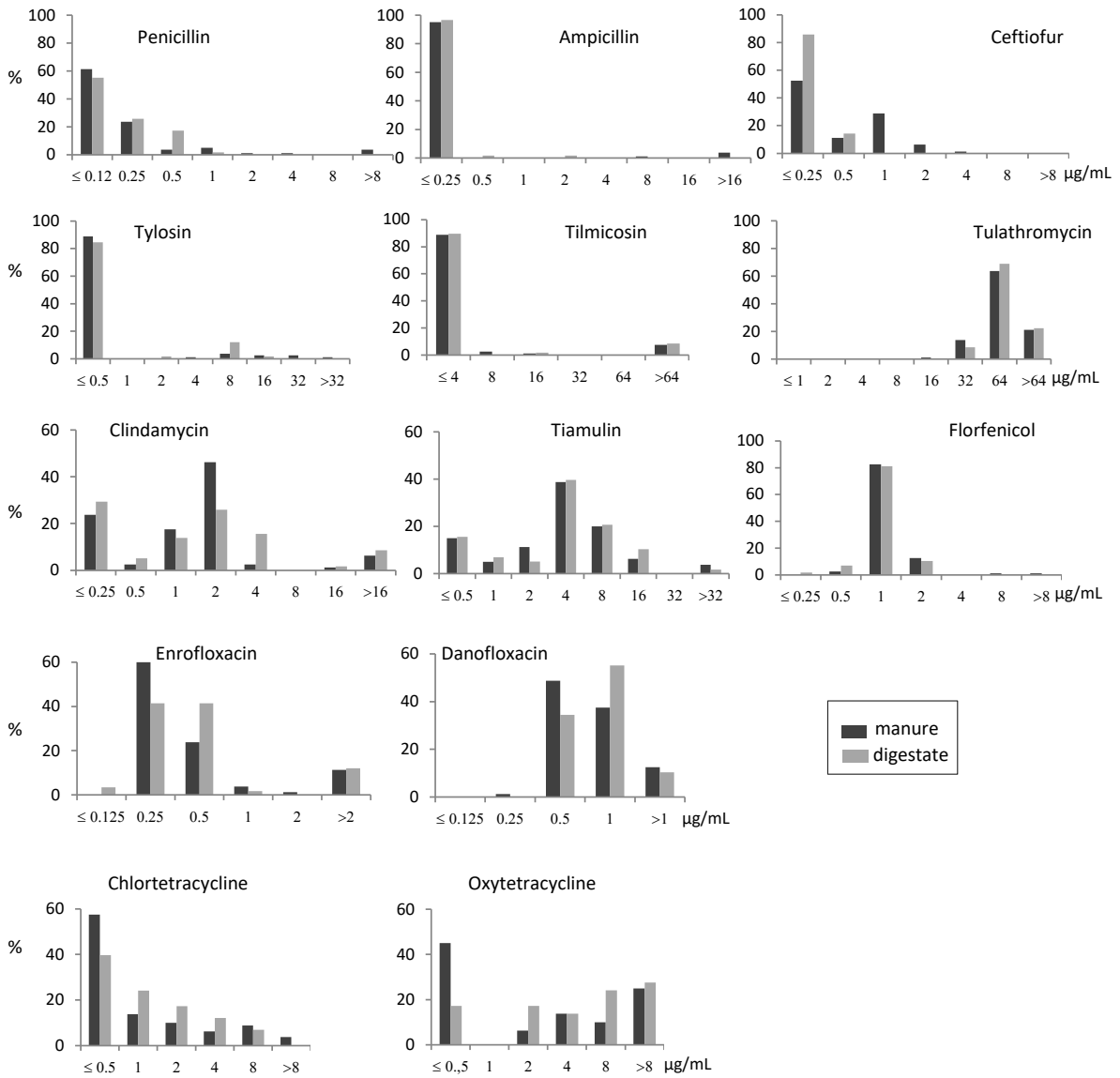


Figure S2. MIC distribution of 13 antimicrobials against *C. perfringens* isolates in manure and raw digestate in three BGPs.

**Table S1.** Process parameters of the three biogas plants.

Biogas plant	composition of the manure	Proportion of manure among feedstock (%)	Hydraulic retention time (day)	Average temperature (°C)
BGP1	pig manure	66.1 ± 6.4	42.7 ± 4.2	40.0 ± 0.2
BGP2	dairy and poultry manure <sup>a</sup>	59.2 ± 5.6	73.1 ± 7.5	40.2 ± 0.9
BGP3	pig manure	98 ± 1.8	42.3 ± 6.5	32.7 ± 5.2

<sup>a</sup> proportion of dairy manure / poultry manure of 7/1 (w/w)

**Table S2.** MIC of 14 isolates (belonging to groups I to V) from the three BGPs obtained on Sentititre FRAM1ANA (µg/mL)

Isolates <sup>a</sup> (Group)	MRD <sup>b</sup>	LZD	MXF	TGC	P/T4	PIP	PEN	VAN	AMOX	CHL	AUG2	CLI	RIF	IMI
D1 <sub>18</sub> (V)	16	2	2	≤0.5	≤1/≤2	≤1	0.25	≤0.5	≤0.125	8	≤0.125/≤0.06	>64	≤0.5	≤0.06
M1 <sub>15</sub> (II)	4	2	1	≤0.5	≤1/≤2	≤1	0.5	≤0.5	≤0.125	8	≤0.125/≤0.06	>64	≤0.5	≤0.06
D3 <sub>1</sub> (V)	8	2	1	≤0.5	≤1/≤2	≤1	0.5	≤0.5	≤0.125	4	≤0.125/≤0.06	>64	≤0.5	≤0.06
D3 <sub>24</sub> (IV)	4	2	1	≤0.5	≤1/≤2	≤1	0.25	≤0.5	≤0.125	8	≤0.125/≤0.06	>64	≤0.5	≤0.06
D3 <sub>8</sub> (IV)	8	4	2	≤0.5	≤1/≤2	≤1	0.25	≤0.5	≤0.125	8	≤0.125/≤0.06	>64	≤0.5	≤0.06
D1 <sub>20</sub> (III)	16	2	1	≤0.5	≤1/≤2	≤1	0.25	≤0.5	≤0.125	4	≤0.125/≤0.06	4	≤0.5	≤0.06
M3 <sub>1</sub> (I)	>32	2	>4	≤0.5	16/>4	8	0.5	4	≤0.125	16	≤0.125/≤0.06	>64	8	0.5
M3 <sub>10</sub> (II)	>32	8	>4	>32	>64/>4	>64	>8	>8	≤0.125	4	8/4	>64	≤0.5	≤0.06
M3 <sub>12</sub> (II)	>32	>16	>4	>32	≤1/≤2	16	>8	>8	>32	>16	>32/>16	>64	32	4
D3 <sub>11</sub> (III)	>32	>16	>4	>32	>64/>4	>64	>8	>8	>32	>16	>32/>16	>64	>64	>64
D3 <sub>13</sub> (III)	>32	>16	>4	>32	>64/>4	>64	>8	>8	>32	>16	>32/>16	>64	>64	>64
D3 <sub>16</sub> (III)	>32	>16	>4	>32	>64/>4	>64	>8	>8	>32	>16	>32/>16	>64	>64	>64
M2 <sub>34</sub> (I)	>32	>16	>4	>32	>64/>4	>64	>8	>8	>32	>16	>32/>16	>64	>64	>64
M3 <sub>18</sub> (I)	>32	>16	>4	>32	>64/>4	>64	>8	>8	>32	>16	>32/>16	>64	>64	>64

<sup>a</sup> isolates selected on the heatmap (Figure S1); M1, manure from BGP1; D1, digestate from BGP1; M2, manure from BGP2; M3, manure from BGP3; D3, digestate from BGP3.

<sup>b</sup> MRD: Metronidazole, LZD: Linezolid, MXF: Moxifloxacin, TGC: Tigecycline, P/T4: Piperacillin/ Tazobactam constant 4, PIP: Piperacillin, PE: penicillin, VAN: vancomycin, CHL: Chloramphenicol, AUG2: Amoxicillin / Clavulanic Acid, CLI: Clindamycin, RIF: Rifampicin, IMI: Imipenem.

**Chapitre 3 : Influence de différents paramètres de la digestion anaérobie sur la persistance de bactéries indicatrices et de deux *Clostridia* pathogènes en réacteurs mésophiles semi-continus**

---



## Avant-propos

L'influence des paramètres de gestion de la digestion anaérobie voie liquide tels que le temps de séjour hydraulique (TSH), la charge organique ou l'application d'un prétraitement thermique (70°C, 1h) à l'effluent d'entrée, sur les bactéries d'origine entérique, est peu documentée. L'objectif de cette étude était d'estimer l'impact de ces trois paramètres sur deux bactéries indicatrices d'efficacité de traitement (*E. coli* et entérocoques) et sur deux *Clostridia* pathogènes (*C. perfringens* et *C. difficile*).

L'originalité notre approche réside (i) dans l'utilisation de pilotes fonctionnant en semi continu et non en systèmes batch comme dans la plupart des études menées en laboratoire, (ii) du suivi de bactéries naturellement présentes dans le lisier, permettant de s'affranchir du biais associé à l'apport de souches cultivées en laboratoire, et (iii) dans l'utilisation d'un plan d'expérience permettant d'estimer les interactions éventuelles des trois paramètres.

Le plan d'expérience est constitué de 12 essais réalisés à l'aide de pilotes de digestion anaérobie mésophile (**Figure 21**) alimentés avec un intrant constitué de lisier de porc tamisé à 5 mm, prétraité thermiquement ou non, et d'un co-substrat (broyat d'aliment pour chevaux).

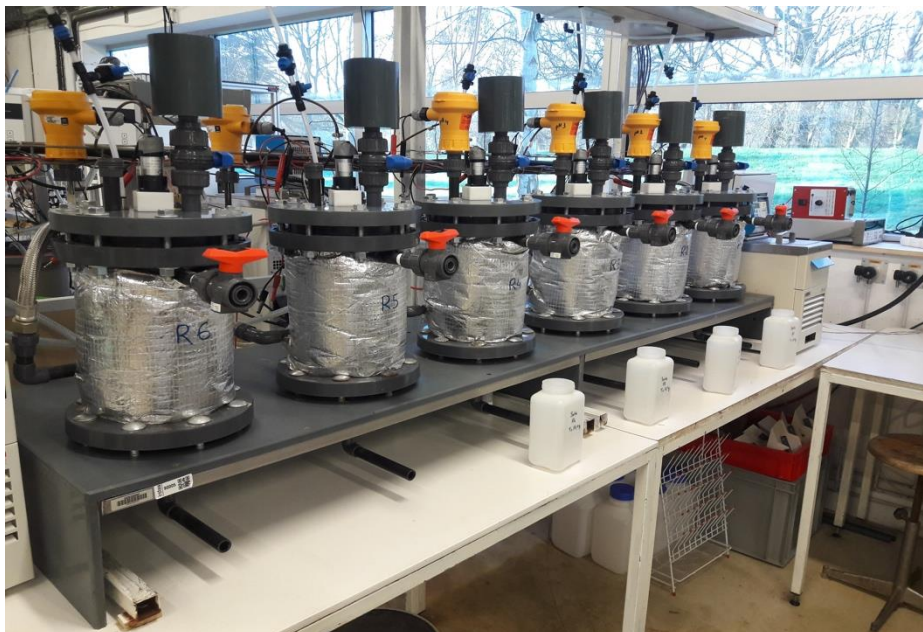


Figure 21: Réacteurs semi-continus utilisés dans le plan d'expérience

Les niveaux des deux facteurs continus (TSH et charge organique) ont été sélectionnés avec les contraintes suivantes :

- TSH ni trop long pour que la durée du plan d'expérience soit raisonnable (durée de stabilisation des réacteurs de 2,5 TSH), ni trop court pour ne pas s'éloigner de la réalité du terrain ;
- Charge organique suffisante pour observer une production de biogaz mais pas trop élevée pour ne pas engendrer de dysfonctionnement des pilotes par surcharge lors des alimentations trois fois par semaine.

Les valeurs retenues (24 et 46 jours avec point central à 35 jours pour le TSH, 2 et 4 g DCO L<sup>-1</sup> J<sup>-1</sup> avec point central à 3 g DCO L<sup>-1</sup> J<sup>-1</sup> pour la charge) respectent les contraintes précédentes et leur faisabilité a été validée lors de pré-essais.

Une fois l'état stationnaire atteint, les réacteurs ont été suivis pendant un mois au cours duquel des prélèvements hebdomadaires ont été effectués sur le mélange alimentant chaque réacteur et sur le digestat soutiré afin de suivre le devenir des quatre bactéries, quantifiées par méthodes culturales, et de quatre paramètres physicochimiques (matières volatiles, acides gras volatiles, azote ammoniacal total, pH).



# Influence of operating conditions on the persistence of indicator bacteria and of two pathogenic *Clostridia* in semi-continuous mesophilic anaerobic reactors.

Derongs Lorine<sup>1</sup>, Druilhe Céline<sup>1</sup>, Le Maréchal Caroline<sup>2</sup>, Barbut Frédéric<sup>3, 4</sup>, Heurtevent Lorette<sup>1</sup>, Buffet Julie<sup>1</sup>, Martin Laure<sup>2</sup>, Ziebal Christine<sup>1</sup>, Poezevara Typhaine<sup>2</sup>, Rouxel Sandra<sup>2</sup>, Houard Emmanuelle<sup>2</sup>, Syed Zaidi Rabab<sup>3, 4</sup>, Couturier Jeanne<sup>3, 4</sup>, Pourcher Anne-Marie\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRAE, OPAALE Research Unit, CS 64427, F-35044 Rennes, France

<sup>2</sup>ANSES, Ploufragan-Plouzané Laboratory, Hygiene and Quality of Poultry and Pig Products Unit, BP53, F-22440 Ploufragan, France

<sup>3</sup> National reference laboratory for *Clostridium difficile*, Saint-Antoine Hospital, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, 34 rue Crozatier, 75012 Paris, France

<sup>4</sup> UMR INSERM S-1139, Faculté de Pharmacie de Paris, Université de Paris

## 1. Abstract

The impact of operational parameters, hydraulic retention time (HRT) and organic loading rate (OLR), and of pretreatment of manure (70 °C, 1 hour), on the sanitary quality of digestate, is rarely reported. This study investigated the combined effect of HRT (24, 35, 46 days), OLR (2, 3, 4 COD. L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) and heat pretreatment on the concentration of *Escherichia coli*, enterococci, *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile* in digestate sampled from semi-continuous mesophilic reactors fed with pig manure. Without heat pretreatment, the sensitivity to the anaerobic digestion process ranked *E. coli* > enterococci > *Clostridia*. Anaerobic digestion led to a Log<sub>10</sub> removal > 3 (*E. coli*), 0.9-2.1 (enterococci), 0.1-0.6 (*C. perfringens*) and 0-2 (*C. difficile*). Increasing HRT only impacted *E. coli*, which was not detected at an HRT of 46 days, whereas increasing OLR reduced the Log<sub>10</sub> removal of enterococci and *C. difficile*. Heat pretreatment led to non-detection of *E. coli*, slightly reduced the concentration of *C. perfringens*, whereas the concentration of *C. difficile* was slightly higher than that observed in digestate from reactors fed with unheated manure. Enterococci, not detected in the heated manure, were present in digestate at a same level as without thermal treatment. Enterococci, *C. perfringens* (types A and C), *C. difficile* (PCR-ribotype 078) were present in digestate at a relatively stable level regardless of the operating conditions, indicating that even with heat pretreatment of the manure, the biosafety of digestate cannot be guaranteed in mesophilic conditions.

Keywords: anaerobic digestion, thermal treatment, indicator bacteria, *C. perfringens*, *C. difficile*, operational parameters

## 2. Introduction

The biogas sector is among the objectives of the Energy Transition for Green Growth Law adopted in 2015 by the French Parliament: the reduction of greenhouse gas emissions, the development of renewable energies and of the circular economy. Decentralization of renewable energy has been promoted in France in the last decade and had resulted in a significant increase in the number of decentralized on-farm biogas plants (31 sites in 2010 vs 534 in 2020), and simultaneously in an increase in the volume of digestate intended for use as crop fertilizer. Spreading digestates on the land, the most common use of this by-product, enables recycling of nutrients and organic matter, creating an on-site circular economy. However, spreading digestate may also involve the risk of disseminating pathogens in field soil (Jiang *et al.*, 2020; Orzi *et al.*, 2015). French on-farm biogas plants, commonly fed with the pig or cattle manure produced by one farm as basic feedstock, mainly operate within the mesophilic temperature range (35-42 °C) which has been reported to be less effective than thermophilic temperatures in reducing pathogens (Jiang *et al.*, 2020; Nag *et al.*, 2019; Pandey and Soupir, 2011; Sahlstrom *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2019). Zoonotic pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* or thermotolerant *Campylobacter* have been detected in digestate from mesophilic digesters fed with pig or cattle manure (Le Marechal *et al.*, 2019; Orzi *et al.*, 2015) suggesting their persistence throughout the anaerobic digestion (AD) process. A low impact of mesophilic AD on pathogenic spore-forming bacteria has also been reported (Le Marechal *et al.*, 2019; Lloret *et al.*, 2013; Orzi *et al.*, 2015; Rounsefell *et al.*, 2013).

In addition to the intrinsic characteristics of the bacteria, the main AD parameters that may affect the inactivation of zoonotic pathogens are feedstock composition, operating conditions (temperature, retention time, organic loading rate) and intermediate products (volatile fatty acids, ammonia) (Jiang *et al.*, 2020). Among operational parameters, the impact of digestion temperature (mesophilic vs thermophilic) on bacterial persistence is well established (Jiang *et al.*, 2020; Zhao and Liu, 2019), but less research has focused on retention time and the organic loading rate (OLR). Using mesophilic reactors fed with sludge or with pig manure, Coelho *et al.* (2011) and Dennehy *et al.* (2018), observed no consistent relationship between the increase in retention time from 5 to 20 days or from 21 to 41 days, respectively, and the Log<sub>10</sub> removal of total coliforms, *E. coli* or enterococci. In contrast, Chen *et al.* (2012) reported that the removal of *E. coli* and *Salmonella* sp. in mesophilic reactors fed with sludge, led to a respective increase of 1.08 and 1.79 Log<sub>10</sub>, when retention time was increased from 11 to 25 days. Only two studies, one performed in reactors fed with livestock manure under thermophilic condition (Skillman *et al.*, 2009) and the other under psychrophilic conditions (Rosenblum *et al.*, 2015), tested the effect of OLR on the persistence of bacteria. Skillman *et al.*

(2009) observed no change in *Clostridium perfringens* concentration when OLR was increased from 2.2 to 6.4 g chemical oxygen demand (COD).L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>, whereas in the experiment conducted by Rosenblum *et al.* (2015), the reduction in the concentration of *E. coli*, fecal coliforms and *Enterococcus* sp. was significantly higher for an OLR of 0.3 than for an OLR of 1.3 g volatile solids (VS).L<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>. Due to the scarcity of the available data, combined with the use of different experimental conditions, the role of retention time and OLR in the pathogen removal is still not clear.

To protect both animal and human health, the use of digestate as fertilizer is governed by European Regulation (EC) 1069/2009 and its implementing Regulation (EC) 142/2011. The regulation classifies animal by-products in three categories according to their potential health risks. Among the operating conditions used in anaerobic digesters, only temperature, *via* thermal pretreatment, is accounted for in the EU Regulation. Manure, which is category 2 material, must be pasteurized (particle size, 12 mm; 70 °C; 60 min). It is worth noting that in France, competent authorities may, by derogation, authorize that a pasteurization unit shall not be mandatory for on-farm biogas plants. As most on-farm biogas plants benefit from this derogation, and the current strengthening of French regulations governing digestate application will increase the number of pasteurization units in the coming years, it is important to evaluate the effect of this pretreatment which reduces the concentration of pathogenic vegetative bacteria, but appears to be ineffective in reducing spore forming bacteria (Sahlstrom *et al.*, 2008).

Understanding the role of thermal pretreatment (70 °C, 1 hour), retention time and OLR on the persistence of enteric bacteria is essential to improve the deactivation of pathogens in digestate. As the impact of these parameters is still poorly documented, the aim of this study was to investigate the combined effect of operational parameters and thermal pretreatment, using an experimental design on (i) the chemical parameters that may affect inactivation of pathogens (volatile fatty acids, ammonia), and (ii) the fate of four selected bacteria in digestate sampled from semi-continuous mesophilic reactors fed with pig manure. The targeted bacteria were *E. coli* and enterococci (indicator bacteria commonly used to assess the inactivation of enteric pathogens) and two pathogenic spore forming bacteria. The two pathogens, *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile*, were selected as they are important toxin-producing zoonotic pathogens (Leuzzi *et al.*, 2014; Uzal *et al.*, 2018) and because of their presence in digestate from farm biogas plants (Derongs *et al.*, 2020; Froeschle *et al.*, 2015; Le Marechal *et al.*, 2019; Orzi *et al.*, 2015).

### 3. Material and methods

#### 3.1. Inoculum and influent

Manure and digestate were collected from a large-scale mesophilic biogas plant (biogas plant 1) that treated pig manure and vegetables as co-substrate and has been used in previous studies (Derongs *et al.*, 2020; Le Marechal *et al.*, 2020). Samples were taken two to four times depending on the duration of the runs in the experiment. Both digestate and manure were sieved through a 5-mm mesh sieve.

The digestate used as inoculum was transferred into the reactors immediately after sieving. The sieved manure was stored at 4 °C in 50 L canisters during each run. Before the reactors were fed, the sieved manure was heated at 70 °C for one hour, or not, depending on the experiment. The influent comprised heated manure cooled to 40 °C or unheated manure, mixed with a co-substrate composed of crushed horse food pellets. The ratio of manure and co-substrate, and the feed volume were determined for each reactor according to the targeted organic loading rate (OLR) and the hydraulic retention time (HRT) (Table 1) defined in the experimental design. A microbial analysis of the co-substrate, made of lignocellulosic materials, confirmed the absence of the four targeted bacteria.

**Table 1. Experimental conditions in semi-continuous tests.**

HRT (days)	OLR (g COD. L <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	Influent volume (mL)	% weight per feed <sup>a</sup>	
			sieved manure	co-substrate
24	2	378	98	2
24	4	378	93.8	6.2
35	3	249	91.9	8.1
46	2	185	93	7
46	4	185	84.5	15.5

<sup>a</sup> calculated according to the VS content of the manure (13.2 to 17.3 g kg<sup>-1</sup> wet weight) and the VS content of the co-substrate (816.3 g kg<sup>-1</sup> w w.)

#### 3.2. Experimental procedure in the semi-continuous reactor

Four reactors with an effective 4.05 L working volume were used for each run. The reactors were continuously stirred and operated in a semi-continuous mode. The temperature, maintained at 39 ± 1 °C by circulating water through the reactor jacket, was monitored with a Pt100 probe inserted in the reactor through the lid. To maintain the operating volume of the liquid, each reactor was

equipped with a funnel and a feed valve on the lid and a discharge valve located at the upper side of the reactor.

Feeding and discharge were performed three times a week. The reactors were considered to be operating at a steady state after a period of 2.5 HRT. When the steady state was reached, influent and digestate from each reactor were sampled once a week for one month and their chemical and microbial parameters analyzed.

### **3.3. Thermal pretreatment of the manure**

Thermal pretreatment was performed in a 10-L double wall glass cell filled with 2.5 L of sieved manure previously kept at 4 °C. The cell was equipped with a Pt100 probe to measure the temperature and with a central shaft with a propeller to maintain continuous homogenization of the manure. A heat transfer fluid circulated in the double wall of the cell, the temperature of which was controlled by a thermostat (Ministat 40, Huber, France). The temperature rise time (from 4 to 70 °C) was 68 minutes. The manure was then kept for 1 hour at 70 °C and then cooled to 40 °C before mixing with the co-substrate. The influent was then fed into the reactors.

### **3.4. Experimental design**

Screening experiments were performed using a two-level factorial design to evaluate the factors that have significant effects on the bacterial and physicochemical responses. The factors investigated were two quantitative factors (HRT, expressed in days and OLR, expressed in COD) and one qualitative factor (heat pretreatment of manure). The experimental design was conducted in one block, and central points were performed in duplicate. All factors were evaluated at two levels. The two levels and the central point of HRT and OLR were 24, 46 and 35 days, and 2, 4 and 3 g COD. L<sup>-1</sup>. d<sup>-1</sup>, respectively. The two levels of the qualitative factor were no heat pretreatment or with heat pretreatment (70 °C, 1 h). Experiments were carried out in three runs with four reactors (12 trials) to cover the entire experimental domain as detailed in Table S1.

The levels of HRT were selected to represent a compromise between the common HRT used by large-scale mesophilic biogas plants and a reasonable duration of the experimental design (the reactors were first operated for 2.5 HRT to allow the steady state to be reached). The OLR were selected to enable us to observe biogas production while avoiding a malfunction in the anaerobic reactors.

Analysis of variance (ANOVA) at the 95% confidence level was used to analyze the results. The experimental design and the statistical analysis of the results were carried out using Statgraphics Centurion XVI® software.

### 3.5. Physicochemical analysis

VS, COD and total ammonia nitrogen (TAN) contents and pH were determined using standard methods (APHA, 2012). Volatile fatty acids (VFA) were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC, Varian©, U3000). Samples were first centrifuged (17 700 rcf, for 20 minutes at 4 °C) and the resulting supernatants were used for analysis.

### 3.6. Microbial analysis

For *E. coli*, enterococci and *C. perfringens*, a 25-g sample (influent or digestate) was homogenized in 225 mL of sterile buffered peptone water (BPW; Thermo Fisher Diagnostics SAS, France). Serial 10-fold dilutions were then prepared in BPW. For *C. difficile*, a 1-g sample was 10-fold diluted in BHI supplemented with 0.1% taurocholate, cefoxitin (8 mg/L), and cycloserine (250 mg/L).

#### *E. coli*

One milliliter of each dilution was transferred to a sterile Petri dish and 15 mL of tryptone bile X-glucuronide medium (TBX; Thermo Fisher Diagnostics SAS, France) were added. The plates were incubated at 44 °C for 24 h. Characteristic blue colonies (glucuronidase-positive) were counted. The results are expressed in colony forming units per gram wet weight (cfu.g<sup>-1</sup>).

#### Enterococci

A 0.1-mL aliquot of the ten-fold dilution was plated on Slanetz–Bartley agar (Biokar Diagnostics, France) and incubated at 37 °C for 48 h. Colonies were transferred onto Bile-Esculin-Azide (BEA) agar (Biokar Diagnostics, France) and incubated at 44 °C for 2 h. Black colonies on BEA (esculin-positive) were counted as enterococci. Results are expressed as cfu.g<sup>-1</sup>.

#### *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* were counted according to ISO 7937 (International Standards Organisation ISO, 2005) as previously described by Derongs *et al.* (2020). According to the ISO method, the concentration of *C. perfringens* was calculated based on the total counts of black colonies on Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar and of the number of confirmed colonies ( $n \leq 5$ ) on Lactose

Sulfite broth (gas production and blackening of the culture medium) at a given dilution. The results are expressed in cfu.g<sup>-1</sup>. At each sampling date, confirmed colonies (Lactose Sulfite positive), were purified and suspended in 50% glycerol / 50% Brain Heart Infusion Broth (BHI, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) before being stored at -80 °C.

### ***Clostridioides difficile***

*C. difficile* was counted as previously described by Le Marechal *et al.* (2020). The results are expressed in MPN.g<sup>-1</sup>. At each sampling date, characteristic colonies of *C. difficile* isolated on BHI agar were incubated at 37 °C for 48 h in an anaerobic chamber. The isolates were then stored at -80 °C.

## **3.7. DNA extraction, detection of toxin genes and antimicrobial susceptibility**

A total of 406 *C. perfringens* isolates were collected from the influents (n=220) and the digestates (n=186). DNA was extracted as previously described by Derongs *et al.* (2020) using the Nucleospin® Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Genes *cpa*, *cpb*, *etx* and *iap*, encoding the four major toxins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ , and  $\iota$ ) and genes *cpe*, *netB* and *cpb2* encoding the enterotoxin CPE and the NetB and  $\beta$ 2 toxins, were performed using real-time PCR as described by Derongs *et al.* (2020). The proportion of *C. perfringens* toxinotypes in influents and digestates was compared using the Chi-square test in XLSTAT 2019 (Addinsoft, Bordeaux, France).

Antimicrobial susceptibility profiles of *cpa*-positive isolates from the influent (n=203) and digestate (n=161) were determined by microdilution method (Sensititre™ Bovine/porcine MIC plate) according to the manufacturers' instructions (ThermoFisher Diagnostics, France) as described by Derongs *et al.* (2020). Susceptibility was tested against penicillin, ampicillin, ceftiofur, tylosine tartrate, tilimicosin, tulathromycin, clindamycin, enrofloxacin, danofloxacin, tiamulin, florfenicol, chlortetracycline and oxytetracycline.

A total of 184 *C. difficile* isolates were collected from the influents (n=96) and the digestates (n=88). DNA was extracted as previously described by Le Marechal *et al.* (2020). Detection of *tpi* (triose phosphate isomerase) gene fragment used to identify *C. difficile*, *tcdA* (toxin A) and *tcdB* (Toxin B) was performed using real-time PCR with the primers described by Barbut *et al.* (2019). PCR-Ribotyping, multiplex PCR and sensitivity to six antibiotics were performed on a selection of isolates from the digestates as previously described (Le Marechal *et al.*, 2020). Antimicrobial susceptibility to erythromycin (15 IU), clindamycin (2 IU), moxifloxacin (5  $\mu$ g) and tetracycline (30 IU) was determined

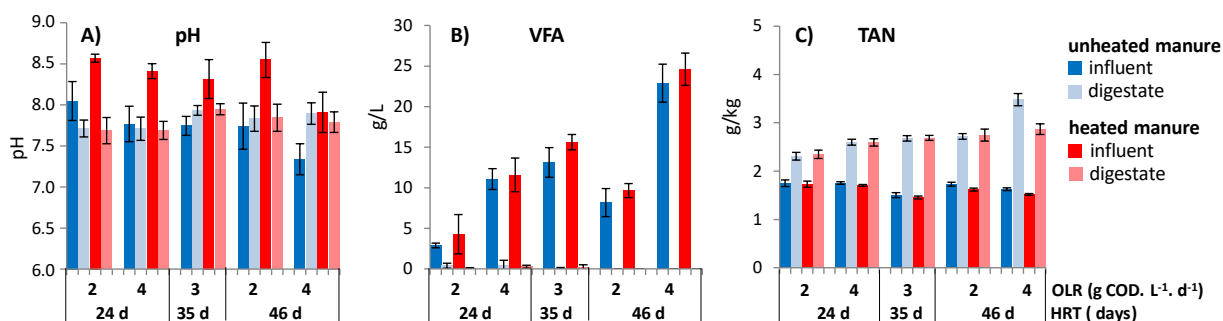
by the disk diffusion method. Vancomycin and metronidazole susceptibility was tested using the MIC method recommended by the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society.

## 4. Results

Three parameters (HRT, OLR whether or not the manure underwent heat pretreatment) were investigated in laboratory-scale anaerobic reactors fed with a mixture of pig manure and co-substrate to determine their effect on pH, VFA and TAN content, and on the concentration of four bacteria. Tables 2 and 3 present the statistical results of the experimental design on the effects of these three factors on the physicochemical parameters in influents and digestates and on the bacterial concentrations in digestates. Factors with p-values less than 5% ( $p < 0.05$ ) were considered significant.

### 4.1. Physicochemical parameters

The variation in HRT and OLR influenced the pH and VFA content of the influent (Figure 1A, 1B, Table 2).



**Figure 1.** Average pH (A), and average concentrations of VFA (B) and TAN (C) in influent (manure heated or not) and in digestate for three HRT (24, 35 and 46 days) and three OLR (2, 3 and 4 g COD. L<sup>-1</sup>. d<sup>-1</sup>). Errors bars represent standard deviation of the 4 samples (24 and 46-days HRT) and the 8 samples (35-days HRT) analyzed for each experimental condition.

The increase in HRT or OLR and their interaction resulted in a significant increase in VFA content, from respectively 2.9 g.L<sup>-1</sup> (lowest HRT and OLR) to 24.6 g.L<sup>-1</sup> (highest HRT and OLR), and in a 0.7 unit decrease in pH. These results were attributed to the change in the composition of the influent depending on the HRT and OLR values (Table 1). The highest HRT and OLR corresponded to the highest proportion of co-substrate, of which the VFA content was higher than that of the manure. The VFA contents in manure and in the co-substrate were  $\leq 0.26$  g.L<sup>-1</sup> and 125.1 g.L<sup>-1</sup>,



respectively. It is worth noting that the TAN content of the co-substrate was very low ( $0.09 \text{ g.kg}^{-1}$ ) compared to that of manure ( $1.7\text{-}2 \text{ g.kg}^{-1}$ ), thereby explaining the absence of influence of HRT and OLR on TAN content of the influent (**Figure 1C, Table 2**).

**Table 2. Variance analysis of the influence of three factors (hydraulic retention time (HRT), organic loading rate (OLR) and thermal pretreatment (Th.Pr)) and of their interactions on pH, VFA and TAN contents of influent and digestate.**

Factor		pH		VFA		TAN	
		Influent	Digestate	Influent	Digestate	Influent	Digestate
A: HRT	F	48.8	2.43	40.09	12.90	1.18	39.57
	p-value	<b>0.0009 (-)</b> <sup>a</sup>	0.179	<b>0.0014 (+)</b>	<b>0.0157 (-)</b>	0.327	<b>0.0015 (+)</b>
B: OLR	F	67.4	0.00	64.95	0.41	0.26	20.77
	p-value	<b>0.0004 (-)</b>	0.958	<b>0.0005+</b>	0.550	0.633	<b>0.0061 (+)</b>
C: Th.pr	F	279.3	0.07	2.13	0.28	0.62	1.86
	p-value	<b>0.0000 (+)</b>	0.796	0.204	0.620	0.466	0.231
AB	F	11.1	0.00	6.42	0.41	0.21	1.19
	p-value	<b>0.0208 (-)</b>	0.958	0.052	0.550	0.665	0.325
AC	F	1.49	0.03	0.06	1.96	0.13	3.96
	p-value	0.277	0.874	0.822	0.221	0.732	0.103
BC	F	0.44	0.11	0.01	0.26	0.01	4.46
	p-value	0.535	0.752	0.917	0.635	0.945	0.081

<sup>a</sup> values in bold followed by the symbol (-) or (+) indicate a negative or positive significant effect or interaction ( $p < 0.05$ ).

While the variation in HRT and OLR and their interaction did not impact the pH of the digestate, which ranged between 7.7 and 7.9 (**Figure 1A**), increasing the two factors significantly increased TAN contents (**Table 2, Figure 1C**). At the lowest HRT and OLR, TAN contents in the digestates were  $2.31 - 2.35 \text{ g.kg}^{-1}$ , whereas at the highest HRT and OLR values, they ranged from  $2.9$  to  $3.5 \text{ g.kg}^{-1}$ , depending on whether the heat pretreatment was applied or not. The VFA contents of the digestates were very low (less than  $0.42 \text{ g.L}^{-1}$ , **Figure 1B**), indicating the proper performance of the pilots. Even if concentrations were low, the increase in HRT resulted in a significant decrease in VFA content in the digestate (**Table 2**), with no detection of VFA with HRT of 46 d ( $<10 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

The heat pretreatment of the manure only significantly affected the pH of the influent, which increased by 0.6 units when the manure was preheated (Figure 1A, Table 2).

## 4.2. Microbial parameters

The concentrations of the four bacteria in the influent remained stable throughout the experiment. In the absence of heat pretreatment, the concentrations ranged from  $3.3 \cdot 10^4$  to  $8.2 \cdot 10^4$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  (*E. coli*, Figure 2A), from  $3.3 \cdot 10^3$  to  $6.8 \cdot 10^3$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  (enterococci, Figure 2B), from  $1.1 \cdot 10^5$  to  $3.8 \cdot 10^5$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  (*C. perfringens*, Figure 2C) and from 12 to 20 MPN.g<sup>-1</sup> (*C. difficile*, Figure 2D).

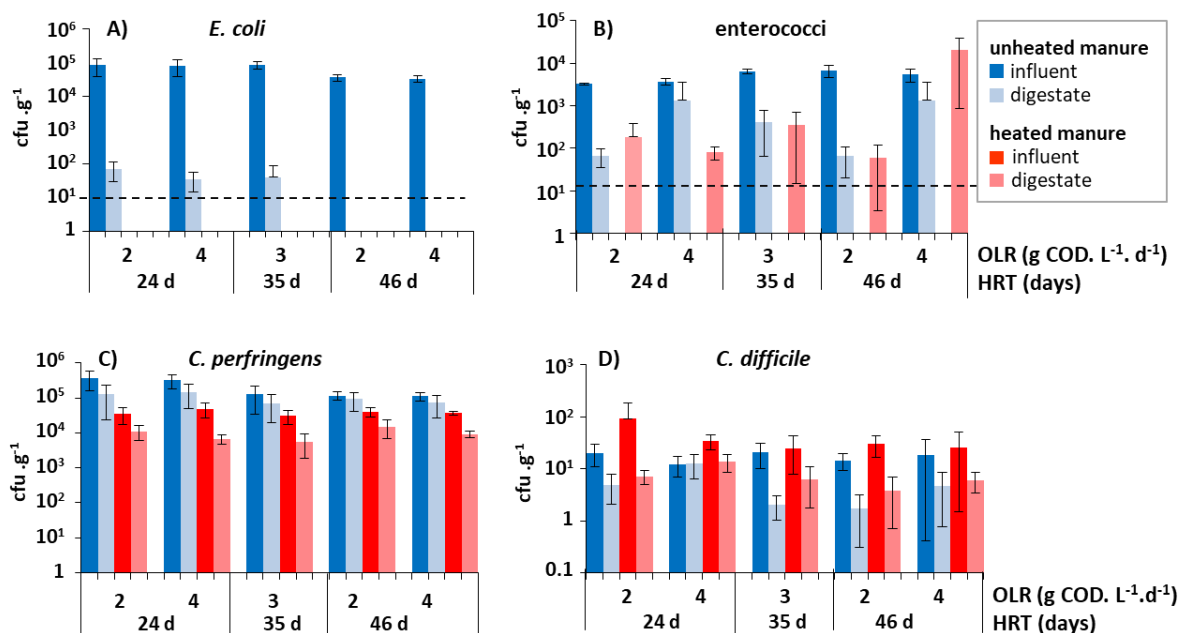


Figure 2. Average concentrations of *E. coli* (A), enterococci (B), *C. perfringens* (C) and *C. difficile* (D) in influent (manure heated or not) and digestate for three HRT (24, 35 and 46 days) and three OLR (2, 3 and 4  $\text{g COD}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). Errors bars represent standard deviation of the 4 samples (24 and 46-days HRT) and the 8 samples (35-days HRT) analyzed for each experimental condition. The dashed line represents the limit of detection.

As shown in Table 3, the concentrations of the bacteria in the digestate were significantly affected by one or two of the operational parameters studied. It is noteworthy that no effect of interactions between HRT, OLR and the heat pretreatment was observed.

**Table 3. Variance analysis of the influence of three factors (hydraulic retention time (HRT), organic loading rate (OLR) and heat pretreatment (Th.Pr)) and of their interactions on the concentrations of bacteria (expressed in Log<sub>10</sub> cfu g<sup>-1</sup>) in the digestates.**

Factor		<i>E. coli</i>	enterococci	<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>
A: HRT	F	15	1.19	1.33	2.07
	p-value	<b>0.0117 (-)</b> <sup>a</sup>	0.325	0.301	0.209
B: OLR	F	0.27	7.32	0.60	12.25
	p-value	0.628	<b>0.043 (+)</b>	0.475	<b>0.0173 (+)</b>
C: Th.pr	F	193.3	0.05	42.9	8.04
	p-value	<b>0.0000 (-)</b>	0.833	<b>0.0012 (-)</b>	<b>0.0365 (+)</b>
AB	F	0.11	3.67	1.09	0.67
	p-value	0.758	0.114	0.344	0.451
AC	F		1.19	1.76	0.00
	p-value		0.325	0.241	0.975
BC	F		0.08	0.41	1.96
	p-value		0.794	0.551	0.220

<sup>a</sup> values in bold followed by the symbol (-) or (+) indicate a negative or positive significant effect or interaction ( $p < 0.05$ ); Empty box indicates that the interpretation of the statistical test was not relevant.

#### **4.2.1. Impact of the HRT and of the OLR on bacteria**

Without heat pretreatment, the AD led to a decrease of more than 3 Log<sub>10</sub> in *E. coli* and of 0.9 to 2.1 Log<sub>10</sub> in enterococci (**Table 4, Figure 2A and 2B**). The changes in OLR did not influence the level of *E. coli* whereas the 46-day HRT led to no detection of this bacterium (**Table 3, Figure 2A**). The OLR significantly impacted the concentrations of enterococci in the digestate (**Table 3**). Indeed, doubling the OLR decreased the Log removal by ca. 1 Log<sub>10</sub> (**Table 4**). HRT had no significant effect on the concentration of enterococci (**Table 3**).

**Table 4. Log<sub>10</sub> reduction in bacterial concentrations between influent and digestate, calculated over the four weeks of the experimental design.**

Manure treatment	HRT (days)	OLR (g COD. L <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i> Mean ± SD	Enterococci Mean ± SD	<i>C. perfringens</i> Mean ± SD	<i>C. difficile</i> Mean ± SD
unheated	24	2	3.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.3
	24	4	3.2 ± 0.8	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.2
	35	3	3.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	1.0 ± 0.2
	46	2	≥3.6	2.1 ± 0.4	0.1 ± 0.3	2.0 ± 0.4
	46	4	≥3.6	1.1 ± 0.8	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.7
heated	24	2	- <sup>a</sup>	≥-0.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.4	0.9 ± 0.4
	24	4	-	≥-0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0
	35	3	-	≥-1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.3
	46	2	-	≥-0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.2
	46	4	-	≥-2.9 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.5

<sup>a</sup> absence of detection of *E. coli* in influent and in digestate; <sup>b</sup> negative values correspond to an increase in Enterococci concentrations during digestion

*C. perfringens* was slightly affected by the AD with a Log<sub>10</sub> reduction ranging from 0.1 to 0.6 without heat pretreatment, and from 0.5 to 0.8 with heat pretreatment, independently of the HRT and the OLR (Table 4, Figure 2C). The Log<sub>10</sub> reduction in *C. difficile*, ranged from 0 to 2, is more difficult to interpret, given the low concentrations of the pathogen in the influent. However, a significant impact of the OLR was observed on the concentration of *C. difficile* (Table 3). The lowest OLR led to the highest Log<sub>10</sub> reduction at both 24 and 46-day HRT with and without heat pretreatment (Table 4, Figure 2D).

#### 4.2.2. Impact of heat pretreatment on bacteria

The heat pretreatment impacted the bacterial concentrations in both the influent and the digestate. Indeed, no *E. coli* and enterococci were detected in the influent (Figure 2A and 2B), the concentration of *C. perfringens* decreased by 0.5 to 1 Log<sub>10</sub> (Figure 2C) and the concentration of *C. difficile* slightly increased by 0.1 to 0.7 Log<sub>10</sub> (Figure 2D).

In the digestates, regardless of the HRT and of the OLR, the heat pretreatment led to no detection of *E. coli* and reduced the concentration of *C. perfringens*, whereas the concentrations of *C. difficile* were slightly higher than those observed in the digestate sampled from the reactors fed with unheated manure (Table 3, Figure S1). Surprisingly, the heat treatment, which reduced enterococci to an undetectable level in the influent, did not affect their concentration in the digestate.

#### 4.2.3. Characterization of spore-forming bacteria

Among the 406 Lactose Sulfite positive isolates of *C. perfringens*, 369 (90.9%) carried the *cpa* gene. Type A represented 99.2% of the *cpa* positive isolates, among which 5.0% carried the *cpb2* gene. Three isolates (0.8%) were type C (*cpb* gene) (Table 5).

**Table 5. Proportion (%) of toxinotypes of *C. perfringens* isolates in the influent and in the digestate of the reactors fed with untreated manure and heated manure.**

Type (genes)	Untreated manure		Heated manure		Total n=369
	Influent	Digestate	Influent	Digestate	
	n=100 <sup>a</sup>	n=99	n=108	n=62	
A ( <i>cpa</i> )	95.0	92.9	100.0	93.5	94.3
A ( <i>cpa</i> + <i>cpb2</i> )	4.0	7.1	3.9	4.8	4.9
C ( <i>cpa</i> + <i>cpb</i> )	1.0	0.0	1.0	1.6	0.8

<sup>a</sup> Number of isolates

There was no significant difference (Chi-square test  $p > 0.67$ ) between the proportion of the three genes in the influent and the digestate whether the manure was preheated or not. The antimicrobial resistance profiles of 364 isolates varied considerably regardless of their origin (manure or digestate) and of the operating conditions (Table S2, Figure S2). With the exception of tulathromycin (MIC 50, 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), most of the isolates were susceptible to  $\beta$ -lactam and macrolides. Enrofloxacin and danofloxacin had low MIC 50 values, 0.5 and 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. Most of the isolates were sensitive to chlortetracycline with a MIC 50 value of 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A few isolates in the influent (n=5) and in the digestate (n=4) were highly resistant to tilmicosin (MIC > 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). One isolate from the digestate differed by its high resistance to tylosin (MIC > 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

All the 184 isolates of *C. difficile* carried the *tpi* gene, confirming their identification (Table 6). With the exception of 1.6% isolates in the digestates (one from the reactor fed with untreated manure and two from the reactor fed with preheated manure), all the isolates carried both *tcdA* and *tcdB* genes.

**Table 6. Proportion (%) of *tpi*, *tcdA* and *tcdB* genes in *C. difficile* isolates taken from the influent and the digestate of the reactors fed with untreated manure and heated manure.**

genes	Untreated manure		Heated manure		Total n=184
	Influent n=48 <sup>a</sup>	Digestate n=42	Influent n=48	Digestate n=46	
<i>tpi</i>	100	100	100	100	100
<i>tcdA</i>	100	97.6	100	95.6	98.4
<i>tcdB</i>	100	97.6	100	95.6	98.4

<sup>a</sup> Number of isolates

The PCR-ribotype and antimicrobial susceptibility of six antibiotics were determined in 10 isolates (one per digestate in each condition tested). All the isolates belonged to PCR ribotype 078 (**Table S3**). They were resistant to clindamycin and erythromycin and susceptible to moxifloxacin, vancomycin and metronidazole. One strain displayed resistance to tetracycline (**Table S3**).

## 5. Discussion

Most French agricultural biogas plants treating livestock manure operate at mesophilic temperatures. However, several studies have demonstrated that the efficiency of mesophilic anaerobic digestion (MAD) with regard to fecal indicators is lower than that of thermophilic anaerobic digestion (Amani *et al.*, 2011; Astals *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2020; Pandey and Soupir, 2011; Watcharasukarn *et al.*, 2009; Ziemba and Peccia, 2011). The operational parameters of the process can be optimized to improve the inactivation efficiency of MAD. The aim of this study was thus to compare the effect of increasing the HRT and the OLR and the impact of including a heat pretreatment on the persistence of four selected bacteria (vegetative and spore forming bacteria).

With no heat pretreatment, sensitivity to the MAD process ranked *E. coli* > enterococci > *Clostridia* (*C. perfringens* and *C. difficile*). This is in agreement with the results of previous studies performed under mesophilic conditions at the lab scale or using field scale reactors (Arias *et al.*, 2020; Bonetta *et al.*, 2011; Chiapetta *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2017; Lopez *et al.*, 2020; Orzi *et al.*, 2015; Watcharasukarn *et al.*, 2009).

### 5.1. Overall impact of MAD on *E. coli* and enterococci

In our study, while the two *Clostridia* were hardly impacted, the Log<sub>10</sub> reduction of *E. coli* and enterococci ranged between 3.1 and ≥3.6 and between 0.9 and 2.1, respectively, depending on the values of the HRT and the OLR. Although all the above studies reported higher inactivation of *E. coli* than enterococci under mesophilic temperatures, the reduction in their concentrations varied with

the experimental conditions. In batch experiments, the Log<sub>10</sub> reduction of *E. coli* and enterococci was respectively 4.9 and 3.1 after six days of incubation (Watcharasukarn *et al.*, 2009) whereas they were 4 and < 1 after 75 days (Arias *et al.*, 2020). At field scale, in semi-continuous stirred tank reactors, the Log<sub>10</sub> reduction of *E. coli* and enterococci were 3.1 and 0 (Bonetta *et al.*, 2011), 2.1 and 0.8 (Chiapetta *et al.*, 2019), 2.8 and 1.4 (Costa *et al.*, 2017), respectively. Orzi *et al.* (2015) compared the sanitation efficiency of eight biogas plants (BGPs) fed with manure and reported a Log<sub>10</sub> reduction in *E. coli* and enterococci between 0->3.7 and 0.3-3.1, respectively, depending on the feedstock used, the initial concentration of the two indicator bacteria, and the operational parameters.

## 5.2. Overall impact of MAD on *C. perfringens* and *C. difficile*

The isolates of *C. perfringens* belonged to two toxinotypes. Most were type A, which has been reported to be the dominant toxin type in farm animals (Fohler *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020; Ngamwongsatit *et al.*, 2016). Only three isolates were type C, a type frequently associated with necrohemorrhagic enteritis of neonatal animals (Freedman *et al.*, 2015; Uzal *et al.*, 2018). The *cpb2* gene encoding the β2 toxin, which is associated with diarrheal diseases (Freedman *et al.*, 2015; Uzal *et al.*, 2018), was found in 5% of the isolates. As previously observed in the manure and digestate of three biogas plants (Derongs *et al.*, 2020), the antimicrobial resistance profiles of *C. perfringens* isolates were not impacted by anaerobic digestion. Moreover, it is noteworthy that none of the three operating conditions (HRT, OLR and heat pretreatment) affected the distribution of the toxinotypes and of the antimicrobial resistance profiles in the digestate.

All isolates of *C. difficile* were PCR-ribotype 078, which is commonly isolated from pigs (Andres-Lasheras *et al.*, 2017; Krutova *et al.*, 2018; Stein *et al.*, 2017) and often associated with *C. difficile* infection in both humans and animals (Connor *et al.*, 2019). Regardless of the operating conditions, the same PCR-ribotype was detected in digestates and was similar to the one previously detected in manure and digestate sampled from this biogas plant (Le Marechal *et al.*, 2020), suggesting their persistence and profile stability throughout the MAD. The resistance of the isolates to the six antibiotics is in agreement with the proportion of antimicrobial resistance in isolates observed by Andres-Lasheras *et al.* (2017) and Knight *et al.* (2017). Indeed, both authors reported that all isolates of pig origin were susceptible to vancomycin and metronidazole, whereas most of the isolates were resistant to clindamycin and erythromycin, the resistance of which is known to be widespread among human and animal *C. difficile* strains (Alvarez-Perez *et al.*, 2017).

As we also observed in our study, it has been reported that MAD has no impact or only a weak impact on *Clostridia* (Arias *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2017; Watcharasukarn *et al.*, 2009). Our results are in agreement with those of Fontana *et al.* (2020), who investigated the effect of the MAD process

on the *Clostridium* consortia, and observed a slight decrease in cultivable *Clostridial* spores (less than  $0.7 \text{ Log}_{10}$ ), mainly represented by *C. perfringens*, in laboratory reactors (HRT of 46 days) fed daily with a mixture of agricultural substrate. The  $\text{Log}_{10}$  reduction in *C. perfringens* for the eight BGPs studied by Orzi *et al.* (2015) ranged between 0 and 3.9 (six of the eight BGPs presented a  $\text{Log}_{10}$  reduction  $\leq 1$ ) again indicating variability of persistence associated with the BGP characteristics.

The impact of MAD on *C. difficile* has rarely been studied. Our results suggest a low impact of MAD on *C. difficile*, in agreement with the results of a study carried out in flasks by Xu *et al.* (2016). These authors reported no reduction in the concentration of spores of five isolates of *C. difficile* ribotype 078 in digested sludge incubated at  $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 53 days and only one of the isolates was inhibited at  $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

There is a consensus that *E. coli* is more sensitive than enterococci and that *Clostridia* are not impacted or only slightly impacted. However, according to data in the literature, it is clear that their fate depends on the operational parameters of the MAD process.

### 5.3. Impact of HRT

As noted in the review by Jiang *et al.* (2020) on inactivation of pathogens in AD process, numerous studies reported the persistence of indicators and spore forming bacteria in batch experiments, and all reported a reduction in *E. coli* and enterococci with the lengthening of retention time. The impact of HRT is less clear in continuous stirred reactors. In our study, increasing the HRT from 24 to 46 days had no impact on enterococci and *Clostridia*. Only the concentration of *E. coli*, not detected with the 46-day HRT, was impacted by increasing this parameter. However, it is noteworthy that at a HRT of 24 days, *E. coli* already showed a relatively high abatement of  $3.1 \text{ Log}_{10}$  leading to an average concentration in the digestate (ranging between  $35$  and  $70 \text{ cfu.g}^{-1}$ ) close to the limit of detection of the method ( $10 \text{ cfu.g}^{-1}$ ). Our results highlight the fact that the sanitary efficiency of the MAD process was not increased, or only slightly increased, when the HRT was increased by 22 days. This is in agreement with the results of the field study conducted by Orzi *et al.* (2015). According to the concentrations observed in the influents and in the digestates of the eight studied BGPs, there was no impact of the HRT (which ranged between 20 and 70 days) on *E. coli* and enterococci. Moreover, in semi-continuous stirred reactors fed with sewage sludge, Lopez *et al.* (2020) observed no consistent trend in the removal efficiency of *E. coli* and enterococci with four HRT ranging between 10 and 20 days corresponding to an OLR of  $1.90$  and  $1.03 \text{ kg VS. m}^{-3}.\text{day}^{-1}$ , respectively. Using semi-continuous tank reactors fed with manure, Dennehy *et al.* (2018) also reported that *E. coli* and enterococci counts in the digestate were not impacted by HRT ranging from 21 to 41 days, corresponding to an OLR of 3 to of  $1 \text{ kg VS. m}^{-3}.\text{day}^{-1}$ .



## 5.4. Impact of the OLR

Two of the four targeted bacteria (enterococci and *C. difficile*) were affected by the increase in the OLR. The impact of the OLR has mainly been studied on biogas production, and very few studies reported its effect on the persistence of indicator or pathogenic bacteria. In our study, increasing the OLR reduced the abatement of the two bacteria. The same trend was reported by Rosenblum *et al.* (2015), who tested different OLR in continuous stirred tank reactors fed with cattle manure under psychrophilic conditions. At three OLR (0.3, 0.8 and 1.3 kg VS.m<sup>-3</sup>.day<sup>-1</sup>) corresponding to three HRT (188.3, 70.6, 43.3 days, respectively), these authors observed that the higher the OLR, the lower the reduction in *E. coli* and enterococci concentration. However, as increasing OLR reduced HRT, it is difficult to estimate if the effects observed were due to one of the two parameters, or to a combination of the two. In a study conducted by Skillman *et al.* (2009) in continuous stirred tank reactors fed with piggery wastewater and maintained at 55 °C, with a short HRT of two days, the reduction in the concentration of *C. perfringens* was slightly negatively impacted by an increase in the OLR from 2.2 to 6.4 g COD.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

## 5.5. Indirect impact of HRT and OLR

Both HRT and OLR can influence the contents of ammonia and volatile fatty acids, two important intermediate products that may have a toxic effect on micro-organisms (Mahdy *et al.*, 2020). Mahdy *et al.* (2020) compared the effect of different HRT and OLR on the TAN and VFA accumulation during AD of chicken manure and reported that the increase in HRT led to a decrease in VFA and to an increase in TAN contents in the digestates. It is important to note that free VFA and free ammonia (FAN) are more toxic than ionized VFA and ammonium ion (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) due to their lipophilic properties that facilitate their passage through the cell membrane (Jiang *et al.*, 2020). Free VFA and FAN contents depend on pH and temperature. In our study, the average values of the pH of the digestate ranged between 7.7 and 7.9 (Table S4) thus favoring the ionized VFA and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> form.

### 5.5.1. Ammonia content

Data on the impact of ammonia on enteric bacteria are scarce and available data mainly focus on *Salmonella*. The effect of ammonia content depends on the type of bacteria. Ottoson *et al.* (2008) observed that *Salmonella* Typhimurium inoculated in dairy manure incubated at 14 °C was more sensitive to 187-190 mM kg<sup>-1</sup> of free NH<sub>3</sub> than *Enterococcus faecalis*. Park and Diez-Gonzalez (2003) reported that *E. coli* O157:H7 was less susceptible than *S. Typhimurium* DT104. Both bacteria

inoculated in LB broth incubated at 37 °C were not inhibited at a concentration of  $\text{NH}_3 < 5 \text{ mM}$ . After six hours of incubation, *Salmonella* was completely inhibited at  $> 40 \text{ mM}$  ammonia whereas 180 mM was needed to obtain  $> 5 \text{ Log}_{10}$  reduction in *E. coli* O157:H7. Jiang *et al.* (2018a) studied the factors responsible for *Salmonella* inactivation during the MAD process, and compared the minimum inhibitory concentration (MIC) value for ammonia on three strains of *Salmonella*. The MIC values ranged between 646 and 841 mM at pH 7.0 and between 690 and 720 mM at pH 8, depending of the serotype inoculated. In our study, the levels of free ammonia in the digestate ranged between 164 and 375  $\text{N-NH}_3 \text{ mg. kg}^{-1}$  (*i.e.*, 11.7 mM and 26.8 mM) (Table S4) and did not reach the concentration that could inhibit the four targeted bacteria.

### **5.5.2. VFA content**

VFA contents were also low, ranging from  $<10$  to  $416 \text{ mg.L}^{-1}$  (Table S3), where propionate represented the major VFA (data not shown). Jiang *et al.* (2018b) studied the fate of indicator bacteria during dry co-digestion of food waste and pig manure and observed a greater impact of free VFA on *E. coli* compared to enterococci. These authors reported that in addition to the residence time, which was the most significant factor in *E. coli* reduction, the free VFA concentration of  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  might be enough to inactivate *E. coli* whereas it did not affect enterococci.

Considering that propionate was the only VFA in our reactors, the VFA content in digestate was less than *ca.* 5.6 mM. Wrigley (2004) observed no inhibition of a *C. perfringens* strain inoculated in a culture medium at pH 7 supplemented with propionate at 10 mM. Jeong *et al.* (2019) observed that the growth *E. faecalis* was not inhibited in presence of propionate at a concentration of 15 mM, the MIC being 1000 mM. Jiang *et al.* (2018a) reported MIC values of propionate for three strains of *Salmonella* ranging from 190 to 236 mM at pH 7.0, and from 381 to 416 mM at pH 8. These data suggest that the VFA contents observed during our experiment were probably not toxic.

## **5.6. Impact of the heat pretreatment**

The drastic effect of the heat pretreatment (70 °C, 1 h.) on the concentration of *E. coli* and enterococci in pig manure we observed is in agreement with the results of previous studies. However, while all the studies that were conducted on sludge or on manure agree that a heat treatment at 70 °C inactivates Gram negative bacteria such as *E. coli*, fecal coliforms or *Salmonella* (Bonjoch and Blanch, 2009; Lang and Smith, 2008; Ruiz-Espinoza *et al.*, 2012; Sahlstrom *et al.*, 2008; Watcharasukarn *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2016), the results obtained for enterococci are less consistent. Despite two studies reporting that the heat treatment at 70 °C for 1 h is not sufficient to

completely inactivate *Enterococcus faecalis* (Watcharasukarn *et al.*, 2009) or enterococci (Bonjoch and Blanch, 2009), it is usually acknowledged that this temperature reduces the concentration of enterococci to undetectable levels (Luste *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2003; Sahlstrom *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2016). Yin *et al.* (2016) pointed out that the degree of inactivation of the heat treatment decreased with an increase in the concentration of total solids (TS) in the effluent. At 70 °C, the time needed for complete inactivation of both fecal coliforms and enterococci in the sludge was 60, 80 and 100 minutes at a TS content of 2%, 4% and 8%, respectively. In our study, the homogeneity of the pig manure, ensured by continuous stirring, and the low TS content (2.1-2.7%) were favorable conditions for heat transfer and consequently for the inhibition of *E. coli* and enterococci. However, the presence of enterococci in the digestate at a concentration close to that observed without heat treatment may be explained by the fact that a small fraction of the bacterial population was heat resistant, as reported by Watcharasukarn *et al.* (2009). Moreover, it has been reported that the heat resistance of enterococci is species and strain dependent (McAuley *et al.*, 2012). Another hypothesis is that enterococci, initially supplied by the inoculum (the digestate of the biogas plant where the manure was collected) used to fill the reactors, were acclimated to the substrates and operating conditions of the reactors, as suggested by Luste *et al.* (2012). Indeed, these authors also observed the presence of enterococci in digestate fed with preheated manure (70 °C, 1 h). Although it is not possible to determine their origin (*i.e.*, heat-resistant fraction or inoculum), it is important to underline that enterococci can establish in the mesophilic digester even after a heat pretreatment.

Both *C. perfringens* and *C. difficile* were generally only slightly impacted by heat pretreatment of the manure, leading to a relatively small decrease in their concentrations in the digestate (0.5 to 0.8 and 0.5 to 1 Log<sub>10</sub> units, respectively). After heat pretreatment, the concentrations of *C. perfringens* in the influent decreased on average by 0.7 Log<sub>10</sub> units whereas those of *C. difficile* increased slightly by *ca.* 0.4 Log<sub>10</sub>. It is unlikely that the spores were strongly inactivated as *C. difficile* and *C. perfringens* are relatively resistant to a temperature of 71 °C (Rodriguez-Palacios *et al.*, 2010; van Asselt and Zwietering, 2006). Sahlstrom *et al.* (2008) also measured an average reduction of 0.4 Log<sub>10</sub> in the number of *C. perfringens* after heating mixed biowaste from a BGP at 70 °C for one hour. The same trend was reported by Watcharasukarn *et al.* (2009), who observed weak abatement (less than 1 Log<sub>10</sub>) in a *C. perfringens* isolate inoculated in cow manure heated at 70 °C for one hour. Pickering *et al.* (2019) heated spores of five *C. difficile* strains of different PCR-ribotypes (including PCR-ribotype 078) at 70 °C for one hour in phosphate buffered saline, and reported that PCR-ribotype 078 was hardly impacted (abatement of 0.3 Log<sub>10</sub>). It should be noted that in our study, the heated manure was cooled to 40 °C before being mixed with the co-substrate. It is possible that the spores were induced to germinate during the 40-minute cooling period. The difference in response

to heat pretreatment of the manure by the two *Clostridia* might be explained by their different ability to germinate under such conditions.

## 6. Conclusion

In the present study, performed in semi continuous stirred reactors at mesophilic temperatures, only *E. coli* was affected by the lengthening of the HRT from 24 to 46 days, and was not detected in digestate when the manure was heated. Even if the impact of this operational parameter remains unclear, it appears that increasing the OLR has only a slight effect or does not help remove pathogenic bacteria. Enterococci and *Clostridia*, particularly *C. difficile*, which is considered as an emerging pathogen, were still present in the digestate at a relatively stable level regardless of the operating conditions (OLR, HRT and heat pretreatment), indicating that even when the manure is pretreated, the biosafety of digestate cannot be guaranteed in mesophilic conditions. Currently, positioning thermal treatment of 70 °C, one hour before or after the digester, is being questioned by stakeholders as post treatment is more attractive from the point of view of energy consumption. Although re-growth of pathogenic bacteria cannot be excluded after a post heat treatment (Sahlstrom, 2003), this pathway should be explored to determine if the post-treatment is more effective in inhibiting the vegetative cells of Gram-positive bacteria such as enterococci.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the participating farmer. This research was financially supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) (agreement number: 1606C0022). L. Derongs is recipient of an INRAE-Région Bretagne fellowship.

## 7. References

- Alvarez-Perez, S., Blanco, J.L., Harmanus, C., Kuijper, E., Garcia, M.E., 2017. Subtyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078/126 isolates of human and animal origin. *Vet. Microbiol.* 199, 15-22.
- Amani, T., Nosrati, M., Sreekrishnan, T.R., 2011. A Precise Experimental Study on Key Dissimilarities between Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge. *Int. J. Environ. Res.* 5, 333-342.
- Andres-Lasheras, S., Bolea, R., Mainar-Jaime, R.C., Kuijper, E., Sevilla, E., Martin-Burriel, I., Chirino-Trejo, M., 2017. Presence of *Clostridium difficile* in pig faecal samples and wild animal species associated with pig farms. *J. Appl. Microbiol.* 122, 462-472.

- APHA, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, , 22nd ed. American Water Works Association, American Public Health Association, Water Environment Federation,, Washington DC.
- Arias, D.E., Veluchamy, C., Dunfield, K.E., Habash, M.B., Gilroyed, B.H., 2020. Hygienization and microbial metabolic adaptation during anaerobic co-digestion of swine manure and corn stover. *Bioresour. Technol.* 306.
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., Mata-Alvarez, J., 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res.* 46, 6218-6227.
- Barbut, F., Day, N., Bouee, S., Youssef, A., Grandvoinet, L., Lalande, V., Couturier, J., Eckert, C., 2019. Toxigenic *Clostridium difficile* carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 588-594.
- Bonetta, S., Ferretti, E., Bonetta, S., Fezia, G., Carraro, E., 2011. Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 552-557.
- Bonjoch, X., Blanch, A.R., 2009. Resistance of Faecal Coliforms and Enterococci Populations in Sludge and Biosolids to Different Hygienisation Treatments. *Microb. Ecol.* 57, 478-483.
- Chen, Y., Fu, B., Wang, Y., Jiang, Q., Liu, H., 2012. Reactor performance and bacterial pathogen removal in response to sludge retention time in a mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 106, 20-26.
- Chiapetta, H., Harrison, J., Gay, J., McClanahan, R., Whitefield, E., Evermann, J., Nennich, T., Gamroth, M., 2019. Reduction of Pathogens in Bovine Manure in Three Full-scale Commercial Anaerobic Digesters. *Water Air Soil Pollut.* 230.
- Coelho, N.M.G., Droste, R.L., Kennedy, K.J., 2011. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Res.* 45, 2822-2834.
- Connor, M.C., McGrath, J.W., McMullan, G., Marks, N., Guelbenzu, M., Fairley, D.J., 2019. Emergence of a non-sporulating secondary phenotype in *Clostridium (Clostridioides) difficile* ribotype 078 isolated from humans and animals. *Sci. Rep.* 9.
- Costa, A., Gusmara, C., Gardoni, D., Zaninelli, M., Tambone, F., Sala, V., Guarino, M., 2017. The effect of anaerobic digestion and storage on indicator microorganisms in swine and dairy manure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24135-24146.
- Dennehy, C., Lawlor, P.G., McCabe, M.S., Cormican, P., Sheahan, J., Jiang, Y., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018. Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics. *Waste Manage.* 71, 532-541.
- Derongs, L., Druilhe, C., Ziebal, C., Le Marechal, C., Pourcher, A.-M., 2020. Characterization of *Clostridium perfringens* Isolates Collected from Three Agricultural Biogas Plants over a One-Year Period. *Int. J. Env. Res. Public Health* 17.

- Fohler, S., Klein, G., Hoedemaker, M., Scheu, T., Seyboldt, C., Campe, A., Jensen, K.C., Abdulmawjood, A., 2016. Diversity of *Clostridium perfringens* toxin-genotypes from dairy farms. BMC Microbiol. 16.
- Fontana, A., Soldano, M., Bellassi, P., Claudio, F., Gallucci, F., Morelli, L., Cappa, F., 2020. Dynamics of *Clostridium* genus and hard-cheese spoiling *Clostridium* species in anaerobic digesters treating agricultural biomass. Amb Express 10.
- Freedman, J.C., Theoret, J.R., Wisniewski, J.A., Uzal, F.A., Rood, J.I., McClane, B.A., 2015. *Clostridium perfringens* type A-E toxin plasmids. Res. Microbiol. 166, 264-279.
- Froeschle, B., Messelhaeusser, U., Hoeller, C., Lebuhn, M., 2015. Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic *Clostridia* in biogas processes. J. Appl. Microbiol. 119, 936-947.
- International Standards Organisation ISO, 2005. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs, Horizontal Method for the Enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony-Count Technique. ISO 7937. International Standards Organisation, Geneva, Switzerland.
- Jeong, S., Lee, Y., Yun, C.-H., Park, O.-J., Han, S.H., 2019. Propionate, together with triple antibiotics, inhibits the growth of Enterococci. J. Microbiol. 57, 1019-1024.
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z., Yang, Q., McCarthy, G., Tan, S.P., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018a. Inactivation of *Salmonella* during dry co-digestion of food waste and pig for manure. Waste Manage. 82, 231-240.
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018b. Inactivation of enteric indicator bacteria and system stability during dry co-digestion of food waste and pig manure. Sci. Total Environ. 612, 293-302.
- Jiang, Y., Xie, S.H., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z.H., Wu, G.X., Zhan, X.M., Gardiner, E., 2020. Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: A review. Renew. Sust. Energ. Rev. 120.
- Knight, D.R., Squire, M.M., Collins, D.A., Riley, T.V., 2017. Genome Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. Frontiers in Microbiology 7.
- Krutova, M., Zouharova, M., Matejkova, J., Tkadlec, J., Krejci, J., Faldyna, M., Nyc, O., Bernardy, J., 2018. The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in piglets in the Czech Republic clusters with *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates from Germany, Japan and Taiwan. Int. J. Med. Microbiol. 308, 770-775.
- Lang, N.L., Smith, S.R., 2008. Time and temperature inactivation kinetics of enteric bacteria relevant to sewage sludge treatment processes for agricultural use. Water Res. 42, 2229-2241.
- Le Marechal, C., Druilhe, C., Reperant, E., Boscher, E., Rouxel, S., Le Roux, S., Poezevara, T., Ziebal, C., Houdayer, C., Nagard, B., Barbut, F., Pourcher, A.-M., Denis, M., 2019. Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants. MicrobiologyOpen 8.

- Le Marechal, C., Gateau, C., Poezevara, T., Couturier, J., Rouxel, S., Zaidi, R.S., Houard, E., Pourcher, A.-M., Denis, M., Barbut, F., 2020. Characterization of *Clostridioides difficile* strains isolated from manure and digestate in five agricultural biogas plants. *Anaerobe* 62.
- Leuzzi, R., Adamo, R., Scarselli, M., 2014. Vaccines against *Clostridium difficile*. *Hum Vaccin Immunother.* 10, 1466-1477.
- Li, J., Zhou, Y., Yang, D., Zhang, S., Sun, Z., Wang, Y., Wang, S., Wu, C., 2020. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* in chickens and pigs from Beijing and Shanxi, China. *Vet. Microbiol.* 252, 108932-108932.
- Lloret, E., Jose Salar, M., Blaya, J., Antonio Pascual, J., 2013. Two-stage mesophilic anaerobic-thermophilic digestion for sludge sanitation to obtain advanced treated sludge. *Chem. Eng. J.* 230, 59-63.
- Lopez, A., Rodriguez-Chueca, J., Mosteo, R., Gomez, J., Ormad, M.P., 2020. Microbiological quality of sewage sludge after digestion treatment: A pilot scale case of study. *J. Clean. Prod.* 254.
- Luste, S., Heinonen-Tanski, H., Luostarinen, S., 2012. Co-digestion of dairy cattle slurry and industrial meat-processing by-products - Effect of ultrasound and hygienization pre-treatments. *Bioresour. Technol.* 104, 195-201.
- Mahdy, A., Bi, S., Song, Y., Qiao, W., Dong, R., 2020. Overcome inhibition of anaerobic digestion of chicken manure under ammonia-stressed condition by lowering the organic loading rate. *Bioresour. Technol. Rep.* 9, 100359.
- Martinez, S., Lopez, M., Bernardo, A., 2003. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 475-481.
- McAuley, C.M., Gobius, K.S., Britz, M.L., Craven, H.M., 2012. Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 162-168.
- Nag, R., Auer, A., Markey, B.K., Whyte, P., Nolan, S., O'Flaherty, V., Russell, L., Bolton, D., Fenton, O., Richards, K., Cummins, E., 2019. Anaerobic digestion of agricultural manure and biomass - Critical indicators of risk and knowledge gaps. *Sci. Total Environ.* 690, 460-479.
- Ngamwongsatit, B., Tanomsridachai, W., Suthienkul, O., Uairong, S., Navasakuljinda, W., Janvilisri, T., 2016. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. *Anaerobe* 38, 88-93.
- Orzi, V., Scaglia, B., Lonati, S., Riva, C., Boccasile, G., Alborali, G.L., Adani, F., 2015. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Sci. Total Environ.* 526, 116-126.
- Ottoson, J.R., Schnurer, A., Vinneras, B., 2008. In situ ammonia production as a sanitation agent during anaerobic digestion at mesophilic temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 325-330.
- Pandey, P.K., Soupir, M.L., 2011. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *Amb Express* 1.

- Park, G.W., Diez-Gonzalez, F., 2003. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella* Typhimurium DT104 from cattle manure. *J. Appl. Microbiol.* 94, 675-685.
- Pickering, D.S., Vernon, J.J., Freeman, J., Wilcox, M.H., Chilton, C.H., 2019. Investigating the transient and persistent effects of heat on *Clostridium difficile* spores. *J. Med. Microbiol.* 68, 1445-1454.
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R.J., Staempfli, H.R., Weese, J.S., 2010. *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe* 16, 540-542.
- Rosenblum, J., Bisesi, M., Castano, J., Tamkin, A., Ciotola, R., Lee, J., Martin, J., 2015. Influence of seasonal fluctuation and loading rates on microbial and chemical indicators during semi-continuous anaerobic digestion. *Environ. Technol.* 36, 1308-1318.
- Rounsefell, B.D., O'Sullivan, C.A., Chinivasagam, N., Batstone, D., Clarke, W.P., 2013. Fate of pathogen indicators in a domestic blend of food waste and wastewater through a two-stage anaerobic digestion system. *Water Sci. Technol.* 67, 366-373.
- Ruiz-Espinoza, J.E., Mendez-Contreras, J., Alvarado-Lassman, A., Martinez-Delgadillo, S.A., 2012. Effect of low temperature thermal pre-treatment on the solubilization of organic matter, pathogen inactivation and mesophilic anaerobic digestion of poultry sludge. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 47, 1795-1802.
- Sahlstrom, L., 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 87, 161-166.
- Sahlstrom, L., Aspan, A., Bagge, E., Danielsson-Tham, M.L., Albihn, A., 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* 38, 1989-1994.
- Sahlstrom, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.-L., Albihn, A., 2008. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 99, 7859-7865.
- Skillman, L.C., Bajsa, O., Ho, L., Santhanam, B., Kumar, M., Ho, G., 2009. Influence of high gas production during thermophilic anaerobic digestion in pilot-scale and lab-scale reactors on survival of the thermotolerant pathogens *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* in piggery wastewater. *Water Res.* 43, 3281-3291.
- Stein, K., Egan, S., Lynch, H., Harmanus, C., Kyne, L., Herra, C., McDermott, S., Kuijper, E., Fitzpatrick, F., FitzGerald, S., Fenelon, L., Drudy, D., 2017. PCR-ribotype distribution of *Clostridium difficile* in Irish pigs. *Anaerobe* 48, 237-241.
- Thomas, C., Idler, C., Ammon, C., Herrmann, C., Amon, T., 2019. Inactivation of ESBL-/AmpC-producing *Escherichia coli* during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of chicken manure. *Waste Manage.* 84, 74-82.
- Uzal, F.A., Navarro, M.A., Li, J., Freedman, J.C., Shrestha, A., McClane, B.A., 2018. Comparative pathogenesis of enteric *Clostridial* infections in humans and animals. *Anaerobe* 53, 11-20.



- van Asselt, E.D., Zwietering, M.H., 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 73-82.
- Watcharasukarn, M., Kaparaju, P., Steyer, J.-P., Krogfelt, K.A., Angelidaki, I., 2009. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants. *Microb. Ecol.* 58, 221-230.
- Wrigley, D.M., 2004. Inhibition of *Clostridium perfringens* sporulation by *Bacteroides fragilis* and short-chain fatty acids. *Anaerobe* 10, 295-300.
- Xu, C., Salsali, H., Weese, S., Warriner, K., 2016. Inactivation of *Clostridium difficile* in sewage sludge by anaerobic thermophilic digestion. *Can. J. Microbiol.* 62, 16-23.
- Yin, F., Li, Z., Wang, D., Ohlsen, T., Dong, H., 2016. Performance of thermal pretreatment and mesophilic fermentation system on pathogen inactivation and biogas production of faecal sludge: Initial laboratory results. *Biosys. Eng.* 151, 171-177.
- Zhao, Q., Liu, Y., 2019. Is anaerobic digestion a reliable barrier for deactivation of pathogens in biosludge? *Sci. Total Environ.* 668, 893-902.
- Ziemba, C., Peccia, J., 2011. Net energy production associated with pathogen inactivation during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 45, 4758-4768.

Supplementary data

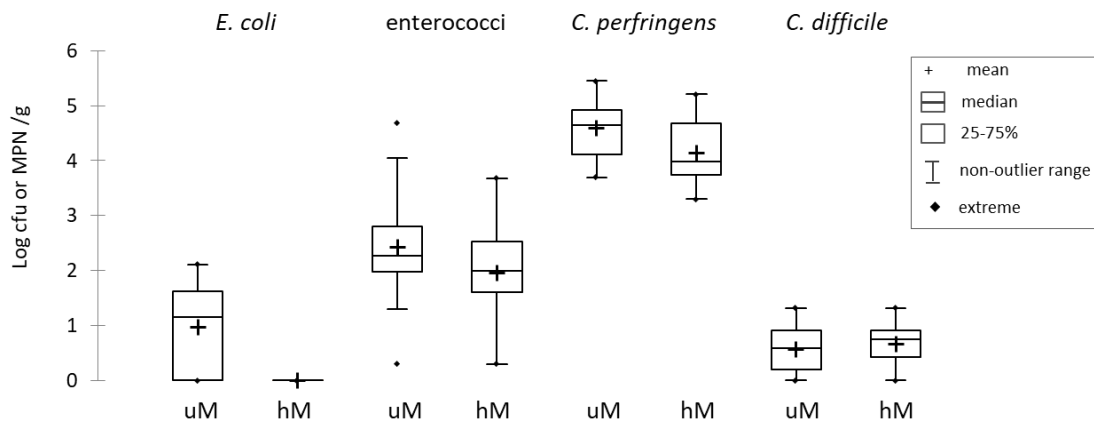


Figure S1. Box plot of the concentration of bacteria in digestates in reactors fed with untreated manure (uM) and with heated manure (hM).

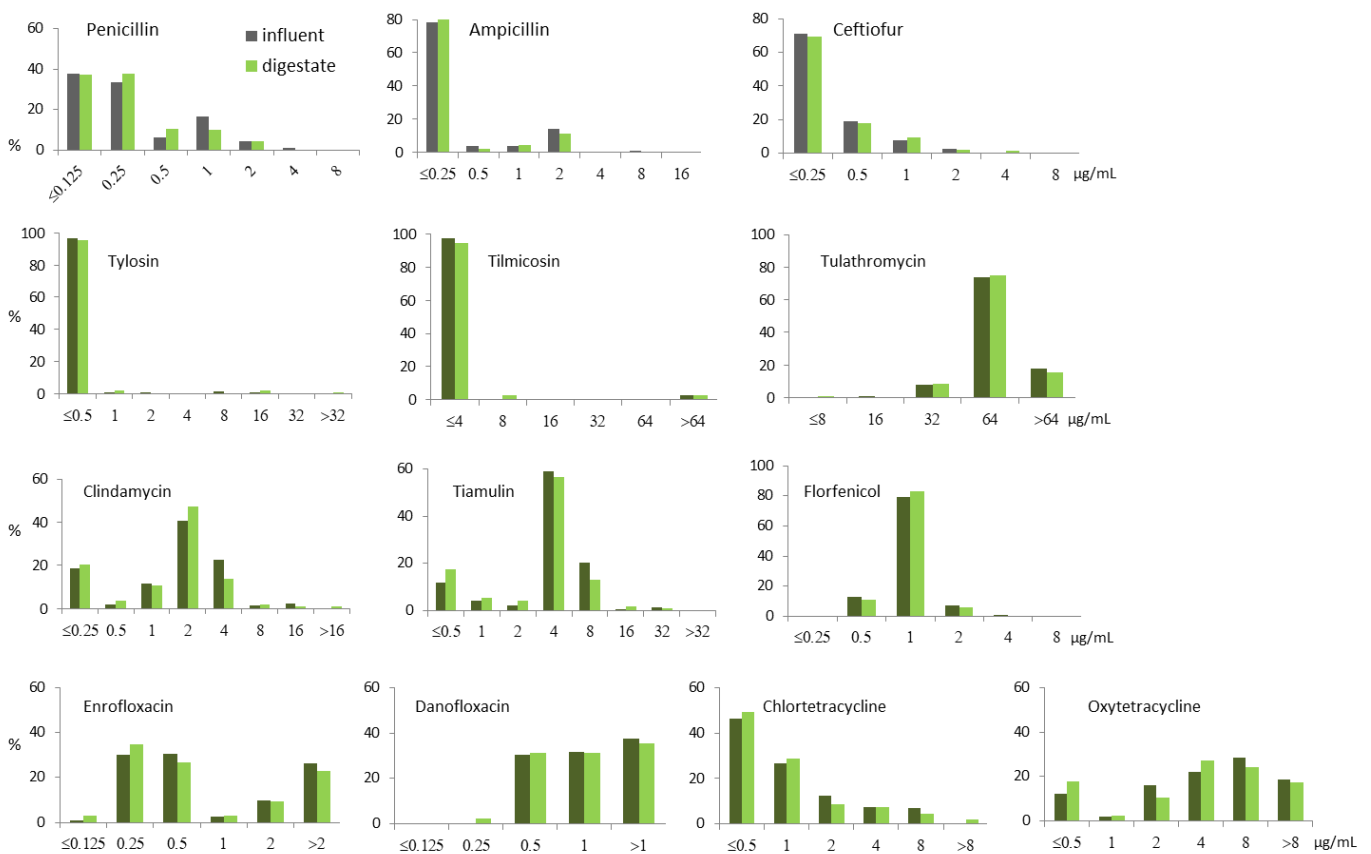


Figure S2. MIC distribution of 13 antimicrobial agents for *C. perfringens* isolates in influent and in digestate of the reactors, regardless of the operating conditions (HRT, OLR and heat treatment of manure)

**Table S1. Factors of experimental trials**

trial	HRT (days)	OLR (g COD L <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	Thermal pre-treatment
1	24 (-1) <sup>a</sup>	2 (-1)	without (-1)
2	24 (-1)	2 (-1)	with (+1)
3	24 (-1)	4 (+1)	without (-1)
4	24 (-1)	4 (+1)	with (+1)
5	35 (0)	3 (0)	without (-1)
6	35 (0)	3 (0)	with (+1)
7	35 (0)	3 (0)	without (-1)
8	35 (0)	3 (0)	with (+1)
9	46 (+1)	2 (-1)	without (-1)
10	46 (+1)	2 (-1)	with (+1)
11	46 (+1)	4 (+1)	without (-1)
12	46 (+1)	4 (+1)	with (+1)

<sup>a</sup> normalized value Statgraphics

**Table S2. MIC 50, MIC90, minimum (min) maximum (max) values of the MIC of 364 *C. perfringens* isolates collected from the influent (n=203) and digestate (n=161) in the reactors regardless of the operating conditions (HRT, OLR and heat pretreatment).**

		PEN <sup>a</sup>	AMP	TIO	TYLT	TIL	TUL	CLI	ENRO	DANO	TIA	FFN	CTET	OXY
influent	min	≤0.125	≤0.25	≤0.25	≤0.5	≤4	16	≤0.25	≤0.125	0.25	≤0.5	0.5	≤0.5	≤0.5
	MIC 50	0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.5	≤4	64	2	0.5	1	4	1	1	4
	MIC 90	1	2	0.5	≤0.5	≤4	>64	4	>2	>1	8	1	4	>8
	max	4	8	2	16	>64	>64	>16	>2	>1	32	4	>8	>8
digestate	min	≤0.125	≤0.25	≤0.25	≤0.5	≤4	8	≤0.25	≤0.125	0.25	≤0.5	0.5	≤0.5	≤0.5
	MIC 50	0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.5	≤4	64	2	0.5	1	4	1	1	4
	MIC 90	1	2	1	≤0.5	≤4	>64	4	>2	>1	8	1	4	16
	max	2	2	4	>32	>64	>64	16	>2	>1	32	2	>8	16

<sup>a</sup> PEN, penicillin; AMP, ampicillin; TIO, ceftiofur; TYLT, tylosin tartrate; TIL, tilmicosin; TUL, tulathromycin; CLI, clindamycin; ENRO, enrofloxacin; DANO, danofloxacin; TIA, tiamulin; FFN, florfenicol; CTET, chlortetracycline; OXY, oxytetracycline.

**Table S3. Genotypic characterization and antimicrobial susceptibility of 10 strains of *C. difficile* isolated from the digestates of the four reactors**

Reactor	HRT (days)	OLR (g COD L <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )	Th.pr <sup>a</sup>	strain code	multiplex PCR					PCR ribotype	Diameter (mm)				MIC (µg mL <sup>-1</sup> )	
					tpi	toxin A (tcdA)	toxin B (tcdB)	binary toxin	deletion pb (tcdC)		disk diffusion method				VAN	MZ
											ERY <sup>b</sup>	MXF	CLI	TET		
R1	24	2	no	MD173	+	+	+	+	-39	078/3	6	27	12	24	0.38	0.5
R2	24	2	yes	MD174	+	+	+	+	-39	078/3	6	28	6	25	0.75	0.25
R3	24	4	no	MD175	+	+	+	+	-39	078/3	6	27	6	24	0.75	0.25
R4	24	4	yes	MD176	+	+	+	+	-39	078/3	6	26	6	24	0.75	0.25
R1	35	2	no	MD205	+	+	+	+	-39	078/3	6	27	6	25	0.5	0.25
R2	35	2	yes	MD206	+	+	+	+	-39	078/3	6	25	6	24	0.75	0.38
R1	46	2	no	MD213	+	+	+	+	-39	078/3	6	26	11	26	0.75	0.5
R2	46	2	yes	MD238	+	+	+	+	-39	078/3	6	24	8	21	0.75	0.38
R3	46	4	no	MD239	+	+	+	+	-39	078/3	6	25	10	24	0.75	0.38
R4	46	4	yes	MD240	+	+	+	+	-39	078/3	6	26	6	24	0.75	0.38

<sup>a</sup>Heat pretreatment.

<sup>b</sup>ERY, erythromycin; MXF, moxifloxacin; CLI, Clindamycin; TET, tetracycline, VAN, vancomycin; MZ, metronidazole

Antimicrobial susceptibility to ERY (15 IU), CLI (2 IU), MXF (5 µg) and TET (30 IU) was determined by the disk diffusion method. Strains were considered susceptible if the inhibition diameter to ERY, CLI, MXF, and TE was greater than or equal to 22 mm, 15 mm, 23 mm and 23 mm, respectively.

Van and MZ susceptibility was tested using the MIC method recommended by the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society.

The tpi (triose phosphate isomerase) gene fragment and of the PaLoc genes (tcdA, tcdB, tcdC) were detected using a multiplex-PCR according to Barbut *et al.* (2019). Capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping was performed as described by Bidet *et al.* (1999). PCR-ribotypes were identified using Webribo software (<https://webribo.ages.at/>).

Barbut F., Day N., Bouee S., Youssouf A., Grandvoinnet L., Lalande V., *et al.* 2019. Toxigenic *Clostridium difficile* carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 25, 588-94.

Bidet P., Barbut F., Lalande V., Burghoffer B., Petit J.C. 1999. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS microbiology letters* 17, 261-6.

**Table S4. Minimum and maximum values of pH, VFAs, TAN and FAN in influent and in digestate**

	pH		VFAs (mg/L)		TAN (mg/kg)		FAN (mg/kg) <sup>c</sup>	
	min	max	min	max	min	max	min	max
influent	7.3	8.0	2909	22897	1505	1755	52.7	256.6
T-influent <sup>a</sup>	7.9	8.6	4270	24613	1455	1730	168.8	629.6
digestate	7.7	7.9	<10	416.0	2307	3480	169.8	375.4
T digestate <sup>b</sup>	7.7	7.9	<10	270.8	2350	2867	163.9	322.0

<sup>a</sup> influent made of pre-heated manure; <sup>b</sup> digestate from reactors fed with pre-heated manure; <sup>c</sup> Free Ammonia Nitrogen (FAN) was calculated based on the equation described in Poirier *et al.* (2016) where T is the temperature (°K):

$$FAN = \frac{10^{pH}}{\exp\left(\frac{6334}{T}\right) + 10^{pH}} \times TAN$$

Poirier, S., Desmond-Le Quemener, E., Madigou, C., Bouchez, T., Chapleur, O. 2016. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: Identification of key microbial phylotypes. *BIORESOURSE TECHNOLOGY*. Vol 207, 92-101



## **Chapitre 4 : Impact de trois paramètres de la méthanisation mésophile sur la structure des communautés microbiennes et sur les gènes de résistance aux antibiotiques**

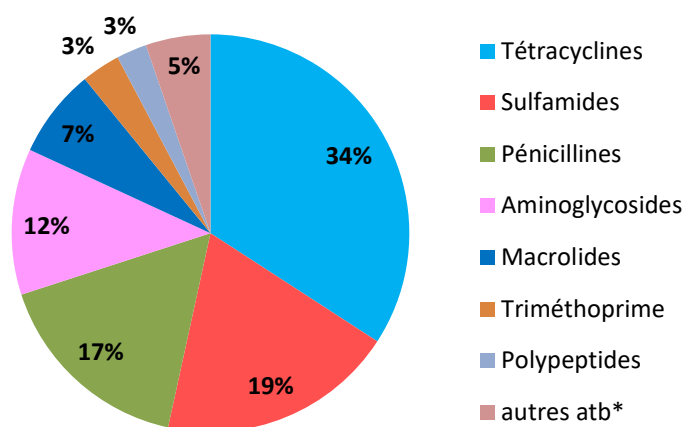
---





## Avant-propos

L'impact des trois paramètres de la méthanisation (TSH, charge organique et prétraitement thermique) a également été estimé sur la composition des communautés microbiennes des digestats ainsi que sur l'antibiorésistance. Cette dernière a été évaluée au travers du suivi des abondances absolues de 14 gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) et d'un élément génétique mobile (le gène *intl1*). La sélection des GRA s'est notamment appuyée sur les données des ventes d'antibiotiques en médecine vétérinaire en France en 2019. Cinq familles (tétracyclines, sulfamides, pénicillines, aminoglycosides et macrolides) représentent en effet plus de 89% du total des ventes d'antibiotiques (Anses 2020<sup>16</sup>) (**Figure 22**). Les GRA que nous avons recherchés comprennent des gènes de résistance aux tétracyclines (gènes *tet*), aux pénicillines (gènes *bla*), aux sulfamides (gènes *sul*) et aux macrolides (gènes *erm*), antibiotiques couramment utilisés pour traiter les animaux d'élevage.



**Figure 22:** Répartition des ventes vétérinaires en 2019 en tonnage de matière active de chaque famille d'antibiotiques en France. \* Phénicoles, Céphalosporines, Pleuromutilines, Lincosamides, Quinolones, Fluoroquinolones, Céphalosporines de 3ème et 4ème génération, autres familles. (Source Anses 2020).

Trois autres GRA ont été recherchés :

- des gènes de résistance aux fluoroquinolones (*qnr*) largement utilisées en clinique humaine mais qui peuvent être réservées pour un usage vétérinaire à l'exemple de l'enrofloxacin ;

---

<sup>16</sup> Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2019. Rapport 2020  
<https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2019.pdf>

- des gènes de résistance à la colistine (*mcr*) utilisée pour traiter les animaux d'élevage ainsi qu'en médecine humaine comme traitement de dernier recours lors d'infections nosocomiales sévères ;
- des gènes de résistance à la vancomycine (*van*), en raison de l'émergence de souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides, notamment en milieux hospitaliers.

Les systèmes d'amorces utilisés pour quantifier neuf GRA (*tetA(P)*, *tetB(P)*, *tet(M)*, *tet(A)*, *mcr 1*, *sul1*, *sul2*, *bla<sub>CTX-M1</sub>*, *bla<sub>CTX-M9</sub>*) et le gène *int1* sont décrits dans la littérature scientifique. Les jeux d'amorces permettant la quantification des gènes *qnrA* et *qnrD* ont été mis au point par l'équipe MERS de l'UMR Agroécologie de INRAE Dijon. Les systèmes d'amorces pour la quantification des gènes *vanA*, *vanB* et *ermQ* ont été développés au cours de la thèse.

Les quantifications des gènes ciblés ont été réalisées au sein de l'équipe MERS (INRAE Dijon) sous la direction scientifique d'Alain Hartmann, de Géraldine Dépret et de David Bru.

## 1. Introduction

Afin de limiter l'épuisement des ressources non renouvelables et réduire les émissions de gaz à effet de serre tout en favorisant l'économie circulaire, il est indispensable d'utiliser des effluents d'élevage comme "engrais renouvelables" (Tambone *et al.*, 2017). Ceux-ci constituent en effet une source de nutriments et de matières organiques permettant d'améliorer la qualité des sols (Bernal *et al.*, 2009 ; Larney *et al.*, 2011 ; Lima *et al.*, 2020). Le développement de la méthanisation à la ferme, en plein essor en Europe, en permettant de valoriser les effluents en biogaz, tout en produisant un digestat capable de remplacer les engrais (Riva *et al.*, 2016), s'inscrit dans cette dynamique d'économie circulaire. Cependant, les antibiotiques à usage vétérinaire, utilisés à des fins curatives, prophylactiques et métaphylactiques (O'Neill Commission, 2015), contribuent au développement de la résistance aux antibiotiques des agents pathogènes humains et animaux (Durso et Cook, 2014; Friedman, 2015; Hoelzer *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2020; Scott *et al.*, 2018). L'épandage des effluents d'élevage qui représente une voie d'entrée des gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) dans les sols, participe à leur dissémination dans l'environnement (Binh *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2014; Wolters *et al.*, 2016b; Zhang *et al.*, 2015). Cette pratique agricole peut faciliter le transfert horizontal de GRA entre les bactéries des effluents, qu'ils aient subi ou non un traitement, et les bactéries indigènes du sol en raison des teneurs élevées en éléments génétiques mobiles (EGM) présents dans les effluents (Binh *et al.*, 2008). Des questions se posent sur le risque associé au recyclage des effluents d'élevage en raison notamment d'une possible transmission de la résistance aux antibiotiques à des végétaux destinés à être consommés crus ou ayant subi une transformation minimale avant leur consommation (Heuer *et al.*, 2011b; Tien *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019).

Dans l'objectif de réduire la dissémination d'antibiotiques et de GRA vers l'environnement, il a été recommandé de limiter l'utilisation d'antibiotiques en production animale (Jiang *et al.*, 2020 ; Pruden *et al.*, 2013 ; Williams-Nguyen *et al.*, 2016 ; Zhao et Liu, 2019 ; Zhu *et al.*, 2013). En France, le ministère en charge de l'agriculture a mis en place les plans "Ecoantibio 1 et 2". L'un des objectifs du premier plan (Ecoantibio 1), était de réduire de 25% l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire en 5 ans. Cet objectif a été dépassé puisque la baisse de l'exposition des animaux aux antibiotiques a été de 37% entre 2012 et 2017, toutes familles d'antibiotiques et toutes espèces animales confondues<sup>17</sup>. Les objectifs du second plan (Écoantibio 2, 2017-2021) sont entre autres, de maintenir dans la durée la tendance à la baisse de l'exposition des animaux aux antibiotiques.

---

<sup>17</sup> <https://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-baisse-de-37-de-l'exposition-des-animaux-aux-antibiotiques>

La réduction de l'utilisation des antibiotiques en élevage intensif est essentielle pour limiter la diffusion environnementale de l'antibiorésistance liée aux épandages des effluents. Mais ces mesures doivent être couplées à des actions menées sur les effluents, ceux-ci pouvant combiner une forte densité de bactéries, d'antibiotiques et de bactéries résistantes (Lima *et al.*, 2020).

Il existe différentes possibilités de traitement des effluents, notamment la déshydratation, le chaulage, le compostage ou la digestion anaérobie. La stabilisation thermique et le chaulage, appliqués aux boues de station d'épuration, permettent d'éliminer partiellement les GRA. Ainsi Murray *et al.* (2019) ont observé que ces procédés conduisaient à un abattement de 1 à 5 Log<sub>10</sub> des GRA. L'impact du compostage sur les GRA est difficile à interpréter en raison des résultats contradictoires de la littérature scientifique. Dans la plupart des études, il est démontré que la température est un facteur essentiel de la réduction des GRA mais son impact diffère en fonction du type de gène de résistance. Le compostage peut diminuer significativement la teneur en GRA, comme l'ont observé, au cours du compostage de fumier de volailles, Le Devendec *et al.* (2016) pour les gènes *ermB* et *tet(M)*, avec des abattements des teneurs relatives de 4,6 et 3,7 Log<sub>10</sub>, respectivement. *A contrario*, les concentrations de certains GRA restent relativement stables, à l'exemple du gène *sul2* (Le Devendec *et al.*, 2016). Les gènes *tet(O)* et *tet(W)* (Storteboom *et al.*, 2007) et les gènes *erm(A)*, *tet(A/C)*, *tet RPP* (Ribosomal Protection Protein) (Sharma *et al.*, 2009) ont été également peu impactés par le compostage de fumiers bovins. L'augmentation des abondances de certains GRA pourrait être due à leur présence dans des bactéries capables de se développer lors de la phase thermophile du compostage (Su *et al.*, 2015).

Dans une étude de terrain menée au Canada, dont l'un des objectifs était de comparer les concentrations en GRA et en EGM dans du lisier bovin subissant différents traitements, Tien *et al.* (2017) ont observé que les abondances absolues des huit gènes (*str(A)*, *sul1*, *bla<sub>PSE</sub>*, *bla<sub>OXA-20</sub>*, *str(B)*, *aad(A)*, *ermF*, *ermB*) et des deux EGM (*int11*, *IncW repA*) étaient systématiquement plus élevées dans le lisier brut que dans le compost de lisier. Les différences de concentrations des gènes ciblés entre les deux types de matrices étaient comprises entre 0,7 Log<sub>10</sub> pour *int11* et 0,8 Log<sub>10</sub> pour *IncW repA*. Elles variaient de 0,9 Log<sub>10</sub> (*sul1*) à 3,9 Log<sub>10</sub> (*bla<sub>OXA-20</sub>*) pour les GRA. Dans cette même étude, la digestion anaérobie mésophile est apparue moins efficace que le compostage pour éliminer les GRA et les EGM. En effet, les différences de concentrations des GRA entre le digestat et le compost fluctuaient de 1,9 Log<sub>10</sub> (*str(A)*) à 5,4 Log<sub>10</sub> (*bla<sub>OXA-20</sub>*). Comme pour le compostage, le comportement des GRA au cours de la méthanisation mésophile dépend du gène ciblé (Wolters *et al.*, 2016b).

Outre le gène lui-même, la température du digesteur influence le degré de réduction des concentrations en GRA. Sun *et al.* (2016) ont comparé, en expériences menées en batch, l'effet de trois températures de digestion de fumier de vaches laitières (20°C, 35°C et 55°C) sur les GRA. Excepté le gène *tet(C)*, les abondances relatives des 10 gènes détectés dans le fumier ont été

réduites de 1 à 2 Log<sub>10</sub> après 2 mois de digestion anaérobie thermophile alors qu'elles n'ont pas diminué significativement en condition psychophile ou mésophile. Une augmentation significative des abondances relatives des gènes *tet(M)* et *tet(X)* a même été observée dans ces conditions. Dans une autre étude, réalisée en batch et simulant la digestion anaérobie thermophile (55°C) et mésophile (35°C) d'un lisier de porc, Zou *et al.* (2020) ont observé que les abondances relatives des cinq GRA ciblés (*sul1*, *sul2*, *tet(A)*, *tet(O)* et *tet(X)*) et du gène *intl1* ont diminué à 55°C, alors que seuls les gènes *intl1*, *sul1* et *tet(O)* ont diminué à 35°C.

Les études menées sur le comportement des GRA au cours de la digestion anaérobie sont peu nombreuses. Lorsqu'elles sont réalisées en laboratoire, elles sont conduites généralement en batch, le seul paramètre étudié étant la température (psychophilie, mésophilie, thermophilie). A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'impact des paramètres de gestion de la méthanisation sur le devenir des GRA. Notre étude avait donc pour objectif d'évaluer, lors de la digestion mésophile semi-continue de lisier porcin, l'impact du temps de séjour hydraulique (TSH), de la charge organique et de l'application d'un prétraitement thermique (70°C, 1h) au lisier, sur (i) la structure des communautés bactériennes et archéennes des digestats, et (ii) l'abondance de 14 GRA (*sul1*, *sul2*, *bla<sub>ctx-M1</sub>*, *bla<sub>ctx-M9</sub>*, *qnrA*, *qnrD*, *ermQ*, *tet(A)*, *tetA(P)*, *tetB(P)*, *tet(M)*, *mcr-1*, *vanA* et *vanB*) et du gène *intl1*.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Pilotes

Les essais ont été menés à l'aide d'un banc de six réacteurs de digestion anaérobie mésophile voie liquide semi-continue dont la description est détaillée au paragraphe 3 du chapitre 3. Le lisier porcin, issu d'un site de méthanisation agricole, a été prélevé trois fois (L1, L2 et L3 pour chaque TSH de 24, 35 et 46 jours), tamisé à 5 mm, et conservé en bidons en chambre froide à 4°C. Les réacteurs, équipés d'une agitation continue, sont chauffés à l'aide d'une double paroi avec recirculation d'eau pour maintenir une température interne comprise entre 38 et 40°C. En début d'expérience, les réacteurs ont été remplis avec le digestat, prélevé sur le même site de méthanisation agricole que le lisier et tamisé à 5 mm. Trois fois par semaine, l'intrant, constitué d'un mélange de lisier de porc tamisé à 5 mm, stocké en chambre froide et prétraité ou non à 70°C pendant 1h, et d'aliment broyé pour chevaux, a été apporté et une quantité équivalente de digestat a été soutirée de chaque réacteur. Les proportions de lisier tamisé et de co-substrat ainsi que le volume de mélange alimentant les réacteurs ont été déterminés en fonction de la charge organique et du temps de

séjour souhaités pour chaque essai du plan d'expérience (**Annexe 1**). Une fois l'état stationnaire atteint, deux prélèvements de digestat ont été réalisés par réacteur à 4 semaines d'intervalle.

## **2.2. Plan d'expérience**

Le plan d'expérience décrit au paragraphe 3 du chapitre 3, est constitué de 12 essais (**Annexe 1**) permettant d'étudier l'impact du TSH, de la charge organique et du prétraitement thermique du lisier sur l'abattement (exprimé en  $\text{Log}_{10}$ ) des concentrations des gènes ciblés. L'abattement correspond à la différence de concentration du gène ciblé dans le lisier L1, L2 ou L3, en fonction du TSH, et la concentration du gène dans le digestat. Les échantillons collectés ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant l'extraction de l'ADN. Les données sont traitées à l'aide du logiciel Stagraphics.

## **2.3. Analyse des structures des communautés microbiennes**

### ***2.3.1. Extraction d'ADN***

L'extraction de l'ADN total des échantillons a été réalisée à l'aide du kit Nucleospin® DNA from Soil (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN est élué de la colonne de silice dans un volume de 60  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution (Tris / HCl 5 mM, pH 8,5). Les extraits sont ensuite conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La pureté et la concentration d'ADN ont été déterminées en mesurant l'absorption à 260 et 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Biophotomètre (Eppendorf, Montesson, France).

### ***2.3.2. Séquençage et analyse de l'ARNr 16S***

Le séquençage a été réalisé par l'amplification de la région V4-V5 hyper variable du gène de l'ARNr 16S. Après l'amplification, les amplicons ont été séquencés selon le protocole décrit par Poirier *et al.* (2016) avec quelques modifications. La région V4-V5 du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée par PCR avec des amorces de fusion 515F (5'-lon A adapter – Barcode – GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3') (Wang *et al.*, 2007) et 928R (5'-lon trP1 adapter – CCCCYCAATTCMTTTRAGT-3') (Wang et Qian, 2009), qui incluent un barcode et des adaptateurs de séquençage qui se fixent aux amplicons au fur et à mesure de leur production lors des cycles de PCR. Le mix de PCR contenait 1X SuperFi Buffer (Invitrogen), 0,2 mM chaque dNTP, 0,5  $\mu\text{M}$  de chaque

amorce, 1U Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen) et 10 à 20 ng d'ADN dans un volume final de 50 µL. L'amplification a été réalisée comme suit : 30 s à 98 °C, 30 cycles de 10 s à 98 °C, 10 s à 50°C, 30 s à 72 °C, suivis d'une extension finale de 5 min à 72 °C. Les produits PCR ont été purifiés en utilisant des billes magnétiques Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) selon les instructions du fabricant, avec un rapport bille/amplicon de 1/2, et ont été élués dans 45 µL de tampon TE (Tris / HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Les amplicons purifiés ont été quantifiés en utilisant les appareils DNA 1000 Kit et 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), en suivant les instructions du fabricant. Les amplicons ont été dilués à 500 pM dans de l'eau de qualité moléculaire et regroupés. Le mélange dilué à 100 pM a été séquençé en utilisant l'ion Torrent Personal Genome Machine avec la puce Ion 316 V2 (Life Technologies) et le kit de séquençage Ion PGM Hi-Q View (Life Technologies) selon les instructions du fabricant.

Les données de séquençage ont été traitées par le logiciel Torrent Suite. Le logiciel a filtré les lectures de séquences polyclonales et de faible qualité, et les données filtrées de qualité ont été exportées sous forme de fichier FastQ.

Les données ont été traitées hors plan d'expérience. Elles ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales (ACP) fondée sur la répartition de l'abondance relative des familles obtenues pour chaque condition testée. Le nombre d'OTU (Operational Taxonomic units) et les valeurs des indices de Simpson et de Shannon, calculés pour chaque réacteur, ont été comparés avec un test de Newman-Keuls. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT 2019 1.1.

## 2.4. Quantification de l'ADNr 16S, du gène *intl1* et des GRA

La quantification de l'ADNr 16S, de *intl1* et de 14 GRA (*tetA(P)*, *tetB(P)*, *tet(M)*, *tet(A)*, *bla<sub>CTX-M1</sub>*, *bla<sub>CTX-M9</sub>*, *mcr-1*, *sul1*, *sul2*, *qnrA*, *qnrD*, *vanA*, *vanB*, *ermQ*) a été réalisée par PCR en temps réel en triplicat à l'aide du système StepOne™ (Applied Biosystem™, pilote: StepOne Software v2.2). Le mélange réactionnel (25 µL) était composé de 12,5 µL de mastermix Takyon™ Rox probe dTTP (Eurogentec, France), 1 µL de chaque amorce (concentration finale : 400 nmol/L), 0,5 µL de sonde (concentration finale : 200 nmol/L), 1,5 µL d'ADN dilué au 1/10 et 5 µL d'eau. Les amorces utilisées sont détaillées en **Annexe 2**Annexe .

Des contrôles négatifs sans ADN ont été préparés lors de chaque analyse. Un ADN témoin contenant le gène ciblé a été réalisé sur chaque gène recherché :

- *tetA(P)*, *tetB(P)* et *ermQ* : *Clostridium perfringens* 175 BCL 67 ;
- *tet(M)* : *Clostridoides difficile* CD17\_412) ; *tet(A)* : *Escherichia coli* AEU7 (ST69);
- *vanA* : *Enterococcus faecalis* 19\_1044 ;

- *vanB* : *Enterococcus faecium* 19\_900,
- *bla<sub>CTX-M1</sub>* et *bla<sub>CTX-M9</sub>* : souche clonée de *E. coli* MSD56622 DH5- $\alpha$  ;
- *sul1* et *sul2* : *E. coli* 41522 ;
- *mcr-1* : *E. coli* DET7 (ST88) ;
- *qnrA* : souche *E. coli* résistante aux fluoroquinolones (collection interne de l'équipe MERS de l'UMR Agroécologie de INRAE Dijon) ;
- *qnrD* : souche de *Proteus mirabilis* MSDJ12139 (CHU Dijon - collection C. Neuwirth).

Les souches ont été aimablement fournies par le Dr O. Firmesse (Anses, Maisons-Alfort, France), le Dr F. Barbut (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France), le Pr. V. Cattoir (Centre hospitalier universitaire, Rennes, France), et le Dr A. Hartmann (INRAE, Dijon, France).

Le programme qPCR pour tous les gènes ciblés à l'exception du gène *ermQ* comprenait un cycle à 95 °C pendant 10 min, 45 cycles à 95 °C pendant 20 s et un cycle à 60 °C pendant 60 s. Pour le gène *ermQ*, le programme qPCR comprenait un cycle à 95 °C pendant 10 min, 45 cycles à 95 °C pendant 15 s, un cycle à 50 °C pendant 20 s et un cycle à 60 °C pendant 30 s.

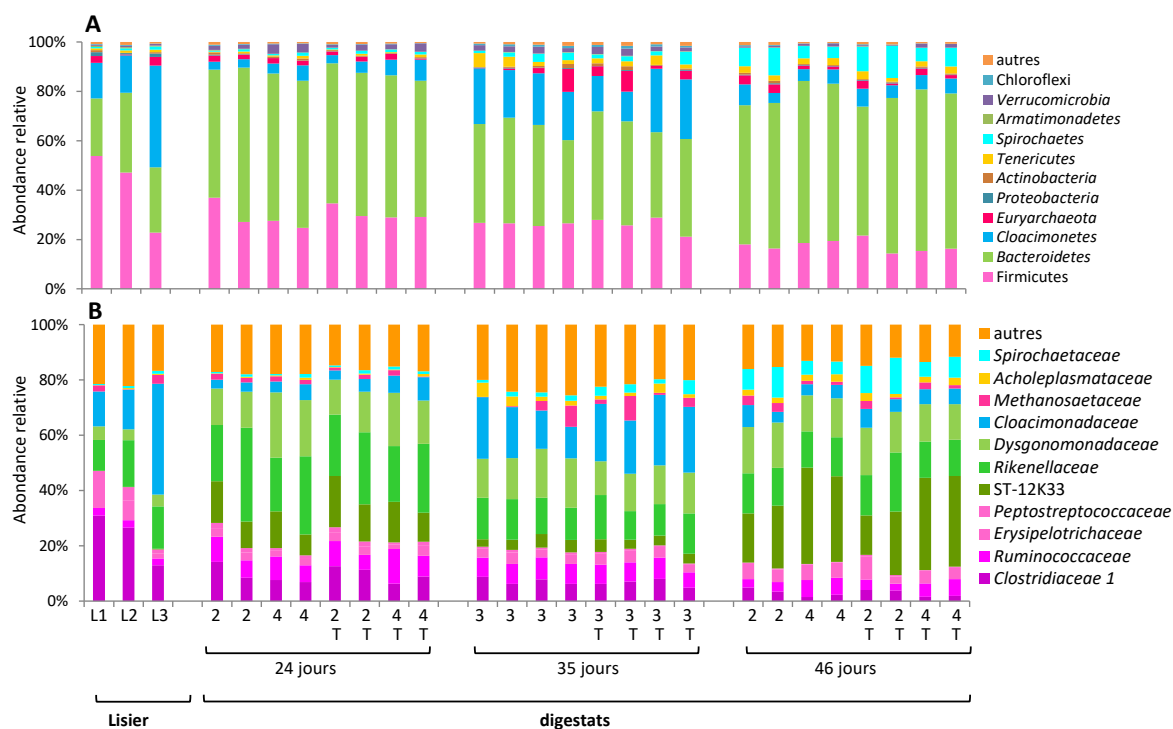
Une matrice de corrélation de Pearson a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT 2019 1.1 sur les concentrations des GRA (exprimées en  $\text{Log}_{10} \text{g}^{-1}$ ) et les proportions des familles majoritaires dans les lisiers et les digestats des réacteurs.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Analyse des structures des communautés microbiennes

Les communautés microbiennes ont été analysées dans les lisiers L1, L2, L3 alimentant les pilotes de chaque série d'expériences correspondant aux trois TSH, et dans les digestats de chacun des 12 essais. Leur abondance relative est présentée sur la **Figure 1**. Les principaux phyla sont représentés par les Firmicutes (14,3 - 53,8%), les *Bacteroidetes* (23,3 – 65,6%), les *Cloacimonetes* (3,2- 41,3%) et les *Spirochaetes* (0,4 – 13,1%). La prédominance des Firmicutes et des *Bacteroidetes* est en accord avec les données de la littérature scientifique. Leur rôle important dans la dégradation de la matière organique des digesteurs alimentés par des lisiers porcins ou bovins a été souligné par Li *et al.* (2014) et Sun *et al.* (2015). Les *Euryarchaeotae*, archées méthanogènes dont la proportion varie de 0,2 à 9,3%, sont essentiellement représentées par les *Methanosaetaceae*.

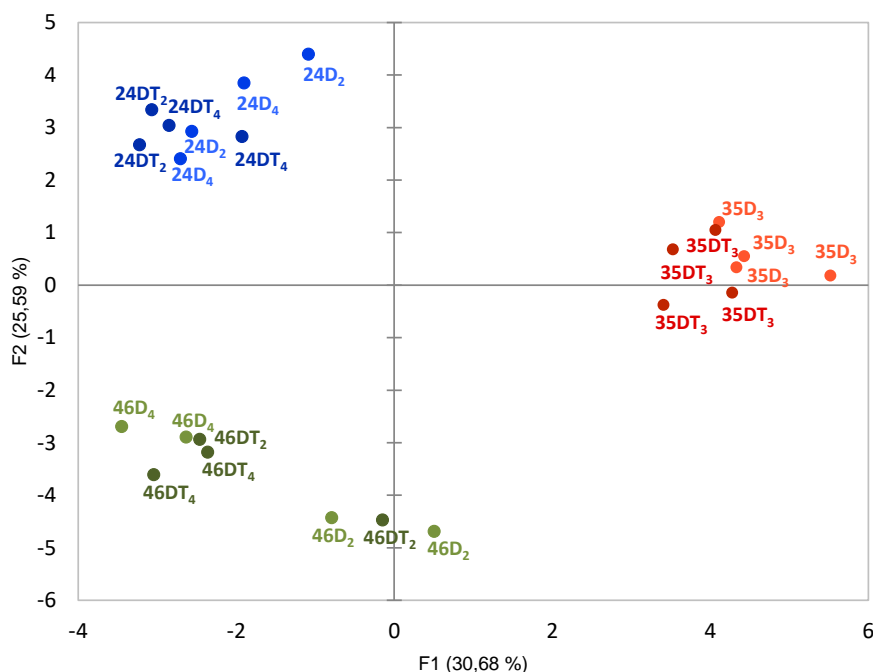




**Figure 1: Proportion des phyla dominants (A) ( $\geq 1\%$ ) et des familles dominantes (B) ( $\geq 5\%$ ) dans les lisiers et les digestats des pilotes pour des TSH de 24, 35 et 46 jours, des charges de 2, 3 et 4 g DCO.  $L^{-1} \cdot j^{-1}$ , avec (T) ou sans prétraitement thermique du lisier. Chaque analyse de digestat a été réalisée sur deux échantillons prélevés à un mois d'intervalle.**

La proportion de *Bacteroidetes*, phylum intervenant dans la dégradation des composés cellulosiques, de 23,2 à 32,2% dans les lisiers, est plus élevée dans les digestats (33,7-65,6%). Sun *et al.* (2015) qui ont mené une étude en réacteurs mésophiles alimentés par du lisier bovin et de la paille avec un TSH de 25 jours et une charge de 2,8 g MV.  $L^{-1} \text{ jour}^{-1}$  ( $\sim 4 \text{ g DCO. } L^{-1} \text{ jour}^{-1}$ ), ont également observé une augmentation de la proportion des *Bacteroidales* qui est passée de 21-39% dans le lisier à 40-65% dans le digestat. Il est possible que l'augmentation de l'abondance relative des *Bacteroidetes* dans notre étude soit due à la présence de composés cellulosiques du co-substrat, constitué d'aliments pour chevaux contenant 13 à 15% de cellulose, selon le fabricant.

L'influence de l'augmentation du TSH est mise en évidence par les résultats de l'ACP réalisée sur l'abondance relative des familles de bactéries et d'archées dans les digestats. Celle-ci distingue trois groupes dont la composition diffère avec le TSH (**Figure 2**).



**Figure 2:** Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les proportions de familles bactériennes et archéennes pour chaque condition testée. Chiffres et cercles bleus, TSH de 24 jours ; chiffres et cercles rouges, TSH de 35 jours ; chiffres et cercles verts, TSH de 46 jours. Les chiffres en indice (2, 3 ou 4) indiquent la valeur de la charge organique. La lettre T indique le traitement thermique à 70 °C, 1h du lisier.

L'effet du TSH est particulièrement visible sur quelques familles bactériennes. En effet, la proportion des *Clostridaceae*, de 20 à 30% dans les lisiers, diminue avec l'augmentation du TSH. Elle est de 6 à 14% pour un TSH de 24 jours et de 1,5 à 5% pour un TSH de 46 jours. A l'inverse, l'abondance relative des *Dysgonomonadaceae*, des *Rikenellaceae* et des ST-12K33 qui appartiennent au phylum des *Bacteroidetes*, ainsi que celle des *Spirochaetes* qui jouent un rôle dans la décomposition des polymères végétaux (Li *et al.*, 2014), augmentent avec l'allongement du TSH. Nos résultats sont contradictoires par rapport à ceux de Dennehy *et al.* (2018) qui n'ont pas observé d'évolution de la répartition des phyla dans des pilotes alimentés avec du lisier bovin pour des TSH compris entre 21 et 41 jours. Ces divergences peuvent s'expliquer par les matrices testées (lisier porcin dans notre étude vs lisier bovin) et par le fait que dans l'étude de Dennehy *et al.* (2018) les TSH étaient dépendants de la charge organique.

Les indices de la diversité alpha sont représentés dans le **Tableau 1**. Le nombre d'OTU (de 290 à 501) se situe dans la gamme de valeurs reportées pour les digestats de pilotes alimentés par des lisiers porcins ou bovins. Celles-ci sont comprises entre 200 à 250 (Shaw *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2015) et 600 à 640 (Dennehy *et al.*, 2018).

**Tableau 1: Alpha diversité des communautés microbiennes des digestats**

CO <sup>a</sup>	TSH <sup>b</sup>	Prétraitement thermique	Nombre d'OTUs	Indice de Shannon	Indice de Simpson
2	24	non	501	3,89	0,94
2	24	oui	435	3,69	0,94
4	24	non	466	3,88	0,96
4	24	oui	423	3,73	0,95
3	35	non	517	4,05	0,95
3	35	non	514	4,29	0,97
3	35	oui	491	3,99	0,95
3	35	oui	473	3,90	0,93
2	46	non	362	3,81	0,94
2	46	oui	339	3,68	0,94
4	46	non	319	3,38	0,88
4	46	oui	290	3,35	0,88

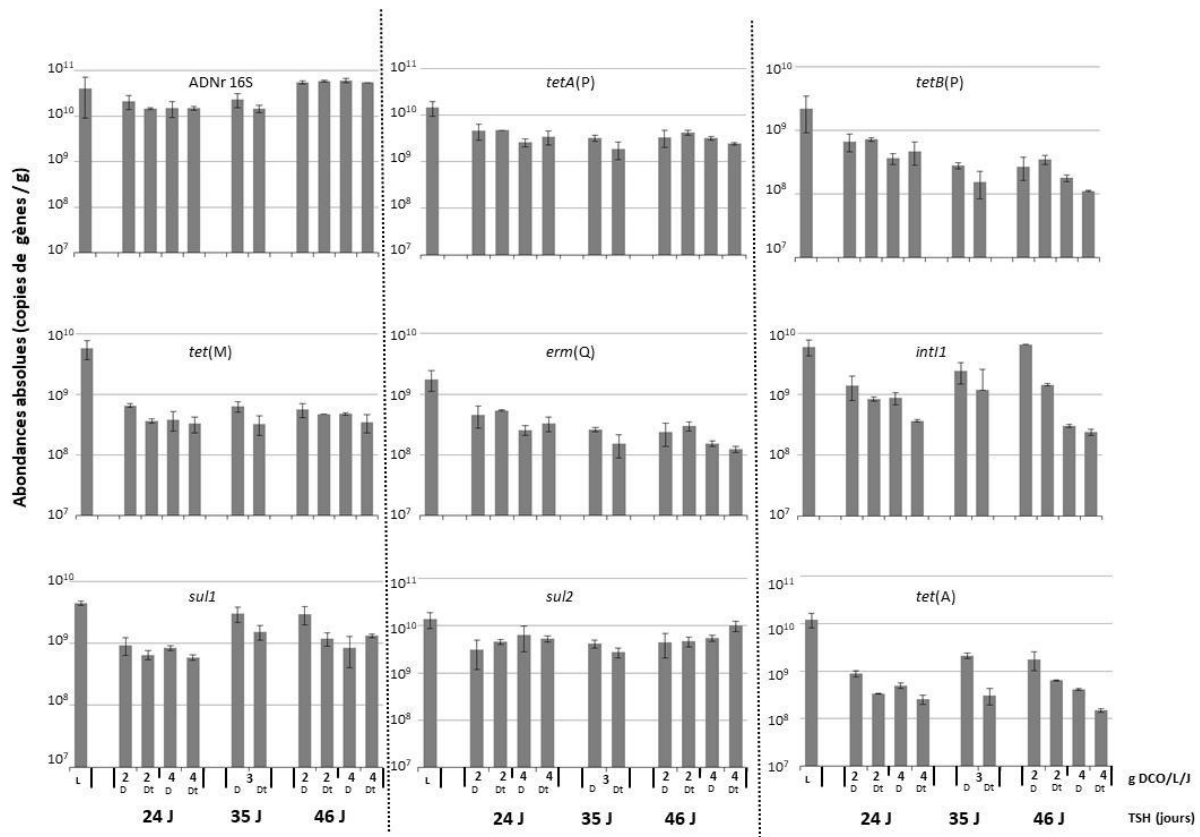
<sup>a</sup>charge organique (g DCO. L<sup>-1</sup>. j<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> temps de séjour hydraulique (jours)

Alors que les valeurs des indices de Shannon et de Simpson ne sont pas significativement impactées par les paramètres de gestion de la méthanisation, le nombre d'OTU diminue significativement pour le TSH de 46 jours ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, même si la différence n'est pas significative, le nombre d'OTU est systématiquement plus faible dans les digestats issus des réacteurs alimentés par le lisier traité thermiquement, ce qui pourrait s'expliquer par l'élimination de formes végétatives lors du traitement à 70°C pendant 1 heure. Les valeurs les plus faibles du nombre d'OTU et des deux indices de diversité ont été obtenues pour le TSH de 46 jours associé à une charge organique de 4 g DCO. L<sup>-1</sup>. j<sup>-1</sup>. Ces conditions correspondent à l'apport maximum de co-substrat (15,5% en masse du mélange entrant dans les pilotes, annexe 1) qui pourrait être responsable de cette diminution de diversité. En effet, Dennehy *et al.* (2018) et Song *et al.* (2017) ont observé que le ratio entre le lisier et le co-substrat impactait la diversité de la communauté microbienne des digestats.

L'évolution de la structure et de la diversité des communautés bactériennes associée à l'allongement du TSH et au traitement thermique du lisier suggère que ces paramètres peuvent favoriser ou inhiber le développement de certaines espèces bactériennes et potentiellement favoriser la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques, et de leurs GRA associés.

### 3.2. Quantification du gène *int11* et des GRA dans les digestats

L'abondance absolue de l'ADNr 16S, de *int11* et de sept des 14 GRA mis en évidence dans les digestats (*tetA(P)*, *tetB(P)*, *tet(M)*, *tet(A)*, *sul1*, *sul2*, *ermQ*) est présentée sur la **Figure 3**. Leurs concentrations dans le lisier alimentant les 3 séries d'expériences sont restées relativement stables tout au long de la mise en œuvre du plan d'expérience, les variations pour un même GRA et pour *int11* ne dépassant pas 0,4 Log<sub>10</sub> (**Annexe 3**).



**Figure 3 : Abondances absolues (copies gènes / g de poids brut) de l'ADNr 16S, de *int11* et de 7 GRA, L: lisier, D: Digestat; Dt: Digestat issu des pilotes alimentés avec du lisier traité thermiquement**

Les concentrations en bactéries totales dans les digestats, stables pour les TSH de 24 et 35 jours ( $1,8 \cdot 10^{10}$  et  $1,9 \cdot 10^{10}$  copies  $g^{-1}$ ), augmentent de 0,6 Log<sub>10</sub> pour un TSH de 46 jours. Indépendamment des conditions de gestion des réacteurs, les valeurs moyennes des abondances absolues des gènes ciblés dans les digestats fluctuent de  $4,9 \cdot 10^7$  copies *tet(A)*.  $g^{-1}$  à  $3,8 \cdot 10^9$  copies *tetA(P)*.  $g^{-1}$ . L'augmentation du TSH a une influence sur l'abondance absolue des gènes *tetB(P)* qui diminue de 0,4 Log<sub>10</sub> entre les TSH de 24 jours et de 35 jours. Une même tendance est observée pour le gène *ermQ* dont l'abondance absolue diminue de 0,3 Log<sub>10</sub> entre les TSH de 24 et 35 jours. En fonction des conditions imposées aux pilotes, la digestion anaérobie conduit à une réduction des concentrations des GRA entre le lisier et le digestat qui est comprise entre 0,1 et 2,0 Log<sub>10</sub> (**Tableau 2**). Les concentrations en gène *int11* ont diminué pour 11 des 12 conditions testées, avec

des abattements compris entre 0,5 et 1,3 Log<sub>10</sub>. Il est à noter que l'augmentation observée pour un TSH de 46 jours et une charge de 2 g DCO. L<sup>-1</sup>. j<sup>-1</sup> est très faible (0,1 Log<sub>10</sub>).

Les abattements fluctuent selon les conditions. Cependant, les gènes les moins impactés sont les gènes *sul* et le gène *tetA(P)* dont l'abattement n'excède pas 0,9 Log<sub>10</sub>.

**Tableau 2: Abattements moyens (duplicats) des concentrations en gènes entre le lisier et les digestats en fonction des paramètres de gestion (TSH, charge organique (CO) et prétraitement thermique du lisier (pTh))**

TSH (jours)	CO	pTh	ADNr 16S	<i>tetA(P)</i>	<i>tetB(P)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>ermQ</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>intl1</i>
24	2	non	0,1	0,6	0,7	0,9	0,7	0,7	0,7	1,0	0,8
	2	oui	0,3	0,6	0,7	1,2	0,7	0,8	0,6	1,4	1,0
	4	non	0,3	0,9	1,0	1,1	1,0	0,7	0,4	1,2	1,0
	4	oui	0,3	0,8	0,9	1,2	0,9	0,9	0,5	1,5	1,3
35 <sup>a</sup>	3	non	-0,1	0,5	0,7	0,8	0,7	0,1	0,3	0,7	0,3
	3	oui	0,1	0,7	1,0	1,1	0,9	0,4	0,5	1,4	0,8
46	2	non	0,1	0,6	0,7	1,2	0,8	0,2	0,6	1,0	-0,1
	2	oui	0,1	0,5	0,6	1,2	0,7	0,6	0,5	1,4	0,5
	4	non	0,1	0,6	0,9	1,2	1,0	0,8	0,5	1,6	1,2
	4	oui	0,1	0,7	1,1	1,4	1,1	0,6	0,2	2,0	1,3
<b>Minimum</b>			<b>-0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,7</b>	<b>-0,1</b>
<b>Maximun</b>			<b>0,3</b>	<b>0,9</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>	<b>0,7</b>	<b>2,0</b>	<b>1,3</b>

<sup>a</sup> Pour le TSH de 35 jours (point central du plan d'expérience dont les essais ont été dupliqués), les abattements correspondent aux valeurs moyennes des duplicats, ces derniers présentant une variabilité très faible.

Excepté dans les études menées sur le terrain par Wallace *et al.* (2018), Tien *et al.* (2017) et Wolters *et al.* (2016a), le suivi des concentrations en GRA et en EGM au cours de la digestion anaérobie de lisiers porcins ou de fumiers bovins a été réalisé dans des flacons ou des pilotes maintenus en anaérobiose. Alors que nous avons observé une légère diminution des concentrations des gènes *sul*, à l'échelle du terrain, Tien *et al.* (2017) ont observé une augmentation des abondances des gènes *sul1* et *intl1* de 0,5 Log<sub>10</sub> au cours de la digestion anaérobie mésophile. Dans cette étude, les concentrations étaient exprimées en poids sec. En tenant compte du taux de matières sèches du lisier (7,5%) et du digestat (3,1%), l'augmentation des abondances de ces deux gènes, exprimées en poids humide, n'est plus que de 0,1 Log<sub>10</sub>. En batch et en conditions mésophiles, l'abondance absolue des gènes *ermQ*, *sul1*, *sul2* et *intl* a toujours diminué quelles que soient les conditions de température (psychrophile, mésophile ou thermophile) et les durées d'expérimentation, de 30 à 90 jours (Ma *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2016; J. Zhang *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2020). Deux des trois études dans lesquelles l'évolution des gènes *tet(M)* a été rapportée, ont mis en évidence

une diminution de ces gènes (Ma *et al.*, 2019; Turker *et al.*, 2018). Sun *et al.* (2016), qui ont comparé l'impact de la température (20, 35 et 55°C) sur le devenir de GRA, ont observé une réduction des concentrations du gène *tet(M)* à 55°C et une augmentation pour les deux autres conditions de température. Dans l'étude de Zou *et al.* (2020), l'abondance du gène *tet(A)* a diminué après 60 jours de digestion anaérobie indépendamment de la température (35 ou 55°C).

Les gènes *vanA* et *vanB* présents dans le lisier à des concentrations de  $2,2 \cdot 10^5$  et  $2,2 \cdot 10^6$  copies.  $g^{-1}$ , respectivement (**Annexe 3**) n'ont plus été mis en évidence dans les digestats. Les gènes *qnrA*, *qnrD*, *bla<sub>ctx-M1</sub>*, *bla<sub>ctx-M9</sub>* et *mcr-1* n'ont pas été détectés dans le lisier et dans les digestats. Bien que dans cette étude le gène *qnrA* n'ait pas été détecté, sa présence a été démontrée dans des lisiers porcins et bovins (Sun *et al.*, 2019; J. Zhang *et al.*, 2018). Il est à noter que l'abondance relative (Sun *et al.*, 2019) ou absolue (J. Zhang *et al.*, 2018) du gène *qnrA* a augmenté au cours de la digestion anaérobie mésophile de fumier bovin ou de lisier de porcs.

Le TSH n'a aucun impact significatif sur l'abattement des concentrations en GRA (**Tableau 3**).

**Tableau 3: Analyse de la variance de l'impact des 3 paramètres (TSH, charge organique et prétraitement thermique) sur l'abattement des concentrations en gènes dans les digestats (en  $Log_{10} \cdot g^{-1}$ )**

Facteurs		ADNr 16S	<i>tetA(P)</i>	<i>tetB(P)</i>	<i>tetM</i>	<i>tet(A)</i>	<i>ermQ</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>int11</i>
TSH	F	0,91	1,36	0,02	1,28	1,06	0,52	1,4	0,88	1,37
	p-value	0,383	0,2953	0,8871	0,3097	0,3494	0,5051	0,2892	0,3912	0,2944
Charge organique	F	0,06	2,85	7,77	0,95	3,7	7,5	0,51	2,97	7,32
	p-value	0,8206	0,1523	<b>0,0386-</b>	0,3746	0,1125	<b>0,0409-</b>	0,5088	0,1454	<b>0,0425-</b>
Prétraitement thermique	F	0,89	0,62	1,03	3,23	7,24	0,51	1,15	0,0	3,53
	p-value	0,3889	0,4684	0,3563	0,1321	<b>0,0433-</b>	0,5059	0,3318	0,973	0,119

<sup>a</sup> Les chiffres en gras suivis du signe "-" indiquent une diminution significative de la réduction de la concentration des gènes dans les digestats ( $p < 0,05$ ). Les valeurs F et p des interactions entre les facteurs ne sont pas indiquées dans la mesure où aucune des interactions n'a un effet significatif sur l'abattement des gènes.

L'augmentation de la charge organique conduit à une réduction significative de l'abondance du gène *int11* et des gènes *tetB(P)* et *ermQ*. Pour le gène *int11*, la différence est surtout marquée pour le TSH de 46 jours pour lequel les abattements des concentrations entre le lisier et le digestat de ce gène sont de 0,2  $Log_{10}$  et 1,3  $Log_{10}$  pour les charges organiques de 2 et 4 g DCO.  $L^{-1} \cdot j^{-1}$ , respectivement. Seul le gène *tet(A)* est significativement impacté par le traitement thermique du lisier mais les différences de concentrations dans les digestats issus des pilotes alimentés par le lisier traité et non traité thermiquement n'excèdent pas 0,7  $Log_{10}$ . La température semble influencer l'abattement des gènes *tet* comme cela a été observé par Zou *et al.* (2020) sur le gène *tet(A)* dont la

réduction de 0,7 Log<sub>10</sub>, en conditions mésophiles, était de 1,2 Log<sub>10</sub> en conditions thermophiles. Dans l'étude menée par Sun *et al.* (2016), alors que la concentration en gène *tet(M)* a augmenté en mésophilie, celle-ci a diminué de 0,7 Log<sub>10</sub> en thermophilie. Une autre étude menée par Zhang *et al.* (2018) a montré que l'abondance du gène *tet(M)* augmente au cours de la digestion anaérobie mésophile. Dans notre étude, même en l'absence de prétraitement thermique du lisier, l'abondance d'aucun des 4 gènes *tet* n'a augmenté.

Même si le prétraitement thermique n'a eu qu'un impact limité sur les GRA, il peut avoir un effet sur les antibiotiques. Ainsi, Wallace *et al.* (2018) ont constaté que le prétraitement thermique du fumier bovin à 67°C pendant 1h réduisait significativement la teneur en tétracyclines, limitant ainsi la pression de sélection exercée par ces antibiotiques.

L'abondance absolue du gène *int1* est positivement corrélée aux GRA ( $p < 0,01$ ) à l'exception du gène *sul2* (**Annexe 4**). Ma *et al.* (2019) ont également noté une corrélation positive entre cet EGM et les gènes *tet(M)*, *ermQ* et *sul1*. Par contre, ils ont observé une corrélation significative entre le gène *int1* et le gène *sul2*. Les abondances des GRA et du gène *int1* ne sont corrélées qu'aux familles appartenant au phylum des Firmicutes (**Tableau 4**).

**Tableau 4: Matrice de corrélation de Pearson entre la distribution des familles bactériennes et les concentrations en GRA et en *int1* (exprimés en Log<sub>10</sub> g<sup>-1</sup>) dans les lisiers et les digestats de chaque réacteur.**

Familles	<i>tetA(P)</i>	<i>tetB(P)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>ermQ</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>int1</i>
<i>Clostridiaceae 1</i>	<b>0,75<sup>a</sup></b>	<b>0,83</b>	<b>0,73</b>	<b>0,63</b>	<b>0,85</b>	0,38	0,37	<b>0,52</b>
<i>Peptostreptococcaceae</i>	<b>0,74</b>	<b>0,81</b>	<b>0,69</b>	<b>0,56</b>	<b>0,82</b>	0,32	0,40	0,46
<i>Cloacimonadaceae</i>	0,07	0,02	0,40	0,45	0,13	<b>0,54</b>	0,05	0,23
<i>Rikenellaceae</i>	0,07	0,31	-0,13	-0,25	0,20	<b>-0,60</b>	-0,27	-0,20
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,32	0,13	0,32	0,25	0,16	0,34	0,27	0,25
<i>Dysgonomonadaceae</i>	<b>-0,65</b>	<b>-0,50</b>	<b>-0,76</b>	<b>-0,53</b>	<b>-0,59</b>	<b>-0,45</b>	-0,37	-0,30
<i>Ruminococcaceae</i>	<b>-0,41</b>	-0,22	<b>-0,54</b>	<b>-0,43</b>	-0,28	<b>-0,48</b>	-0,28	<b>-0,45</b>
<i>Spirochaetaceae</i>	-0,24	<b>-0,43</b>	-0,26	-0,22	<b>-0,41</b>	0,00	-0,09	-0,01
<i>Acholeplasmataceae</i>	<b>-0,39</b>	<b>-0,56</b>	-0,23	-0,08	<b>-0,50</b>	0,19	-0,20	-0,13
ST-12K33	-0,22	<b>-0,39</b>	<b>-0,41</b>	<b>-0,56</b>	<b>-0,42</b>	<b>-0,46</b>	0,14	<b>-0,49</b>

<sup>a</sup> Une corrélation significative ( $\alpha = 0,01$ ) est indiquée par les chiffres en gras

Excepté pour les gènes *sul1* et *sul2*, les abondances absolues des 5 autres GRA sont corrélées à l'abondance relative des *Clostridiaceae* et des *Peptostreptococcaceae* ( $p < 0,01$ ). Luo *et al.* (2017) ont mis en évidence une corrélation positive entre l'abondance dans les digestats des gènes *tet(A)*, *tetB(P)*, *tetA(P)* et l'abondance des *Peptostreptococcaceae*. Dans cette même étude, ils ont également observé qu'il n'y avait pas de corrélation entre les gènes *tet* et les gènes *sul1* et *sul2*, ces

derniers étant corrélés à des *beta-proteobacteria* appartenant au genre *Thiomonas*. La diminution de l'abondance relative des Firmicutes observée dans notre étude pourrait être à l'origine de la réduction de gènes *tet* et *ermQ* au cours de la digestion anaérobie. Song *et al.* (2017) ont également observé une corrélation positive entre les Firmicutes et des gènes de résistance à la tétracycline (*tet(G)*, *tet(X)*) et aux macrolides (*ermX*, *ermB*). Toutefois, les relations entre les évolutions des distributions des familles et les GRA demeurent difficiles à établir, celles-ci étant fondées sur des calculs statistiques et non sur une identification des GRA dans une bactérie donnée.

## 4. Conclusion

La digestion anaérobie mésophile du lisier porcin modifie la composition des communautés bactériennes en favorisant les familles appartenant au phylum des *Bacteroidetes* et en diminuant l'abondance relative des Firmicutes. Elle conduit aussi à une diminution de l'ensemble des GRA mais à un degré plus ou moins marqué selon le gène considéré, les gènes *sul1* et *sul2* étant les moins impactés par le procédé. Le paramètre ayant le plus d'influence sur la diversité bactérienne est le TSH dont l'allongement conduit à une diminution du nombre d'OTU. Ce paramètre n'impacte pas significativement l'abattement des concentrations en GRA et en gène *intl1*. Le prétraitement thermique du lisier, imposé par le règlement européen (CE) n°1774/2002, a peu d'impact sur les communautés bactériennes. Il diminue néanmoins le nombre d'OTU des digestats de 4 à 13% et conduit à une réduction de l'abondance absolue du gène *tet(A)* de 0,3 à 0,7 Log<sub>10</sub>, selon les valeurs du TSH et de la charge organique. La présence d'un traitement thermique du lisier en amont de la méthanisation mésophile n'améliore pas de façon significative la réduction des GRA dans la mesure où la différence d'abattement pour un TSH et une charge organique donnés ne dépasse pas 0,4 Log<sub>10</sub>. Il est difficile d'extrapoler ce résultat en raison d'une part, du faible nombre de GRA ciblés dans cette étude et d'autre part, de la variabilité des abattements des GRA observés dans la littérature au cours du compostage, procédé dont la température maximale est du même ordre de grandeur que celle du prétraitement thermique (de l'ordre de 70 °C).

Avec l'essor actuel de la méthanisation agricole et la nécessité de limiter les risques sanitaires associés à l'épandage des digestats, le traitement thermique des effluents d'élevage en amont des digesteurs va continuer à se développer. Dans ce contexte, il est donc important de mieux comprendre le rôle joué par ce traitement sur l'antibiorésistance en couplant le suivi d'antibiotiques vétérinaires à celui de GRA.



## 5. Références bibliographiques

- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 1642–1645. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq167>
- Bernal, M.P., Albuquerque, J.A., Moral, R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology* 10.
- Binh, C.T.T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., Smalla, K., 2008. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids: Transferable antibiotic resistance plasmids in manure. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 25–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00526.x>
- Dennehy, C., Lawlor, P.G., McCabe, M.S., Cormican, P., Sheahan, J., Jiang, Y., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018. Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics. *Waste Management* 71, 532–541. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.047>
- Durso, L.M., Cook, K.L., 2014. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Current Opinion in Microbiology* 19, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.019>
- Friedman, N.D., 2015. The negative impact of antibiotic resistance 7.
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M., 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1892–1900. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.014>
- Heuer, H., Smalla, K., 2006. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology* 10.
- Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleinedam, K., Schloter, M., Muller, T., Focks, A., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., 2011. Accumulation of Sulfonamide Resistance Genes in Arable Soils Due to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 4.

- Hoelzer, K., Wong, N., Thomas, J., Talkington, K., Jungman, E., Coukell, A., 2017. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Vet Res* 13, 211. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1131-3>
- Jiang, Y., Xie, S.H., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z.H., Wu, G.X., Zhan, X.M., Gardiner, G.E., 2020. Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 120, 109654. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109654>
- Larney, F.J., Hao, X., Topp, E., 2011. Manure Management, in: Hatfield, J.L., Sauer, T.J. (Eds.), *Soil Management: Building a Stable Base for Agriculture*. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp. 245–263. <https://doi.org/10.2136/2011.soilmanagement.c16>
- Le Devendec, L., Mourand, G., Bougeard, S., Léaustic, J., Jouy, E., Keita, A., Couet, W., Rousset, N., Kempf, I., 2016. Impact of colistin sulfate treatment of broilers on the presence of resistant bacteria and resistance genes in stored or composted manure. *Veterinary Microbiology, ARAE 2015, Antimicrobial Resistance of Bacteria from Animals and the Environment* 194, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.012>
- Li, J., Rui, J., Pei, Z., Sun, X., Zhang, S., Yan, Z., Wang, Y., Liu, X., Zheng, T., Li, X., 2014. Straw- and slurry-associated prokaryotic communities differ during co-fermentation of straw and swine manure. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 4771–4780. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5629-3>
- Lima, T., Domingues, S., Da Silva, G.J., 2020. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary Sciences* 7, 110. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030110>
- Luo, G., Li, B., Li, L.-G., Zhang, T., Angelidaki, I., 2017. Antibiotic Resistance Genes and Correlations with Microbial Community and Metal Resistance Genes in Full-Scale Biogas Reactors As Revealed by Metagenomic Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4069–4080. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05100>
- Ma, J., Gu, J., Wang, X., Peng, H., Wang, Q., Zhang, R., Hu, T., Bao, J., 2019. Effects of nano-zerovalent iron on antibiotic resistance genes during the anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology* 289, 121688. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121688>
- Murray, R., Tien, Y.-C., Scott, A., Topp, E., 2019. The impact of municipal sewage sludge stabilization processes on the abundance, field persistence, and transmission of antibiotic resistant

- bacteria and antibiotic resistance genes to vegetables at harvest. *Science of The Total Environment* 651, 1680–1687. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.030>
- O’Neill Commission, 2015. Antimicrobials in agriculture and the environment: Reducing unnecessary use and waste. The Review on Antimicrobial Resistance. London.
- Poirier, S., Desmond-Le Quéméner, E., Madigou, C., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: Identification of key microbial phylotypes. *Bioresource Technology* 207, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.124>
- Pruden, A., Larsson, D.G.J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K.K., Graham, D.W., Lazorchak, J.M., Suzuki, S., Silley, P., Snape, J.R., Topp, E., Zhang, T., Zhu, Y.-G., 2013. Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environmental Health Perspectives* 121, 878–885. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206446>
- Riva, C., Orzi, V., Carozzi, M., Acutis, M., Boccasile, G., Lonati, S., Tambone, F., D’Imporzano, G., Adani, F., 2016. Short-term experiments in using digestate products as substitutes for mineral (N) fertilizer: Agronomic performance, odours, and ammonia emission impacts. *Science of The Total Environment* 547, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.156>
- Scott, A., Tien, Y.-C., Drury, C.F., Reynolds, W.D., Topp, E., 2018. Enrichment of antibiotic resistance genes in soil receiving composts derived from swine manure, yard wastes, or food wastes, and evidence for multiyear persistence of swine *Clostridium* spp. *Can. J. Microbiol.* 64, 201–208. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0642>
- Sharma, R., Larney, F.J., Chen, J., Yanke, L.J., Morrison, M., Topp, E., McAllister, T.A., Yu, Z., 2009. Selected Antimicrobial Resistance during Composting of Manure from Cattle Administered Sub-Therapeutic Antimicrobials. *Journal of Environmental Quality* 38, 567–575. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0638>
- Shaw, G.T.-W., Liu, A.-C., Weng, C.-Y., Chou, C.-Y., Wang, D., 2017. Inferring microbial interactions in thermophilic and mesophilic anaerobic digestion of hog waste. *PLoS ONE* 12, e0181395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181395>
- Song, W., Wang, X., Jie Gu, Zhang, S., Yin, Y., Li, Y., Xun Qian, Wei, S., 2017. Effects of different swine manure to wheat straw ratios on antibiotic resistance genes and the microbial community structure during anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 8.

- Storteboom, H.N., Kim, S.-C., Doesken, K.C., Carlson, K.H., Davis, J.G., Pruden, A., 2007. Response of Antibiotics and Resistance Genes to High-Intensity and Low-Intensity Manure Management. *Journal of Environmental Quality* 36, 1695–1703. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0006>
- Su, H.-C., Pan, C.-G., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Zhou, L.-J., Liu, Y.-S., Tao, R., Zhang, R.-Q., He, L.-Y., 2014. Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale. *Science of The Total Environment* 490, 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.060>
- Su, J.-Q., Wei, B., Ou-Yang, W.-Y., Huang, F.-Y., Zhao, Y., Xu, H.-J., Zhu, Y.-G., 2015. Antibiotic Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7356–7363. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01012>
- Sun, L., Pope, P.B., Eijsink, V.G.H., Schnürer, A., 2015. Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. *Microbial Biotechnology* 8, 815–827. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12298>
- Sun, W., Gu, J., Wang, X., Qian, X., Peng, H., 2019. Solid-state anaerobic digestion facilitates the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements from cattle manure. *Bioresource Technology* 274, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.013>
- Sun, W., Qian, X., Gu, J., Wang, X.-J., Duan, M.-L., 2016. Mechanism and Effect of Temperature on Variations in Antibiotic Resistance Genes during Anaerobic Digestion of Dairy Manure. *Scientific Reports* 9.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F., 2000. Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4605. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000>
- Tambone, F., Orzi, V., D'Imporzano, G., Adani, F., 2017. Solid and liquid fractionation of digestate: Mass balance, chemical characterization, and agronomic and environmental value. *Bioresource Technology* 243, 1251–1256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.130>
- Tien, Y.-C., Li, B., Zhang, T., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Marti, R., Topp, E., 2017. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of The Total Environment* 581–582, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138>

- Turker, G., Akyol, Ç., Ince, O., Aydin, S., Ince, B., 2018. Operating conditions influence microbial community structures, elimination of the antibiotic resistance genes and metabolites during anaerobic digestion of cow manure in the presence of oxytetracycline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.044>
- Wallace, J.S., Garner, Emily, Pruden, A., Aga, D.S., 2018. Occurrence and transformation of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes in dairy manure treated by advanced anaerobic digestion and conventional treatment methods. *Environmental Pollution* 9.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, Y., Qian, P.-Y., 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE* 4, e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Williams-Nguyen, J., Sallach, J.B., Bartelt-Hunt, S., Boxall, A.B., Durso, L.M., McLain, J.E., Singer, R.S., Snow, D.D., Zilles, J.L., 2016. Antibiotics and Antibiotic Resistance in Agroecosystems: State of the Science. *Journal of Environment Quality* 45, 394. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0336>
- Wolters, B., Ding, G.-C., Kreuzig, R., Smalla, K., 2016a. Full-scale mesophilic biogas plants using manure as C-source: bacterial community shifts along the process cause changes in the abundance of resistance genes and mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology* fiv163. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv163>
- Wolters, B., Widyasari-Mehta, A., Kreuzig, R., Smalla, K., 2016b. Contaminations of organic fertilizers with antibiotic residues, resistance genes, and mobile genetic elements mirroring antibiotic use in livestock? *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 9343–9353. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7742-y>
- Zhang, J., Chen, M., Sui, Q., Wang, R., Tong, J., Wei, Y., 2018. Fate of antibiotic resistance genes and its drivers during anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge based on microwave pretreatment. *Bioresource Technology* 217, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.140>

- Zhang, T., Yang, Y., Pruden, A., 2015. Effect of temperature on removal of antibiotic resistance genes by anaerobic digestion of activated sludge revealed by metagenomic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 7771–7779. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6688-9>
- Zhao, Q., Liu, Y., 2019. Is anaerobic digestion a reliable barrier for deactivation of pathogens in biosludge? *Science of The Total Environment* 668, 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.063>
- Zhao, X., Wang, Jinhua, Zhu, L., Wang, Jun, 2019. Field-based evidence for enrichment of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in manure-amended vegetable soils. *Science of The Total Environment* 654, 906–913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.446>
- Zhu, Y.-G., Johnson, T.A., Su, J.-Q., Qiao, M., Guo, G.-X., Stedtfeld, R.D., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>
- Zou, Y., Xiao, Y., Fang, T., Dong, P., 2020. New insight into fates of sulfonamide and tetracycline resistance genes and resistant bacteria during anaerobic digestion of manure at thermophilic and mesophilic temperatures. *Journal of Hazardous Materials* 9.

## 6. Annexes

### Annexe 1: Description du plan d'expérience

#### Conditions expérimentales

TSH (jours)	Charge organique (g DCO. L <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup> )	Volume d'intrant <sup>a</sup> (mL)	Proportion massique de lisier et de co- substrat (%) <sup>b</sup>	
			lisier tamisé	co-substrat
24	2	378	98	2
24	4	378	93,8	6,2
35	3	249	91,9	8,1
46	2	185	93	7
46	4	185	84,5	15,5

<sup>a</sup> constitué d'un mélange de lisier et de co-substrat (aliment broyé pour chevaux) ; <sup>b</sup> calculée en fonction du taux de matière volatile du lisier (13,2 à 17,3 g. kg<sup>-1</sup> poids humide) et du co-substrat (816,3 g. kg<sup>-1</sup> poids humide).

#### Valeurs des facteurs testés dans le plan d'expérience

Essai	TSH (jours) <i>(Valeur normalisée Statgraphics)</i>	Charge (g DCO. L <sup>-1</sup> . j <sup>-1</sup> ) <i>(Valeur normalisée Statgraphics)</i>	Prétraitement thermique (70°C, 1h) <i>(Valeur normalisée Statgraphics)</i>
1	24 (-1)	2 (-1)	Non (-1)
2	24 (-1)	2 (-1)	Oui (+1)
3	24 (-1)	4 (+1)	Non (-1)
4	24 (-1)	4 (+1)	Oui (+1)
5	35 (0)	3 (0)	Non (-1)
6	35 (0)	3 (0)	Oui (+1)
7	35 (0)	3 (0)	Non (-1)
8	35 (0)	3 (0)	Oui (+1)
9	46 (+1)	2 (-1)	Non (-1)
10	46 (+1)	2 (-1)	Oui (+1)
11	46 (+1)	4 (+1)	Non (-1)
12	46 (+1)	4 (+1)	Oui (+1)

**Annexe 2: Amorces utilisées pour la quantification de l'ADNr 16S, du gène *int1* et des GRA par qPCR en système Taqman**

Genes	Primers names	Primers sequence (5'-3')	Size (bp)	References	
ADNr 16S	1369F	CGGTGAATACGTTCCYCGG	124	(Suzuki <i>et al.</i> , 2000)	
	1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT			
	TM1389S	FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-BHQ1			
Integron classe 1	<i>int1</i>	int1-LC1	196	(Barraud <i>et al.</i> , 2010)	
		int1-LC5			
		int1-probe			
Tetracycline	<i>tetA(P)</i>	GE353	TGTAGCACAGATTGTATGGGGA	124	cette étude
		GE355	CCCTGCTTGTGCTCCCTTTA		
		GE354	FAM-TGGCTCGCTTGAAGCTTGATTGCGGA-BHQ1		
	<i>tetB(P)</i>	GE359	TTTTGGGCGACAGTAGGCTT	90	cette étude
		GE361	TGGCAATGACCCTACTGAAACA		
		GE360	FAM-AGAACCAGCAGGGAGAGGCGAAGGTCT-BHQ1		
	<i>tet(M)</i>	GE362	GCTATTGCCACAGAGAGAGAGA	127	cette étude
		GE364	CGGGTCACTGTCGGAGATTT		
		GE363	FAM- TCCGCTCCCTCTGCTGCAAACAACTGT-BHQ1		
	<i>tet(A)</i>	tetA_402F	CTTCATGAGCGCCTGTTTCG	131	cette étude
		tetA_532R	AGCCCGTCAGGAAATTGAGG		
		tetA_480P	FAM-CGCTCCGTTCTTCGCCGCGGCAGCC-BHQ1		
Céfotaxime	<i>bla<sub>CTX-M1</sub></i>	CTX-M1F	CAGCTGGGAGACGAAACGTT	63	cette étude
		CTX-M1R	CCGGAATGGCGGTGTTTA		
		CTX-M1S	FAM-CGTCTCGACCGTACCGAGCCGAC-TAMRA		
	<i>bla<sub>CTX-M9</sub></i>	CTX-M9F	GAGGCGTGACGGCTTTTG	67	cette étude
		CTX-M9R	CGTAGGTTCACTGCGATCCA		
	CTX-M9S	FAM-CGATCGGCGATGAGACGTTTCGT- TAMRA			
Colistine	<i>mcr1</i>	QuantLCRF	TATAAATCCGCGACCAACAA	87	cette étude
		QuantLCRR	GTCATCTAAGCCAACGAGCA		
		QuantLCRS	FAM-TACCGACATCGCGGCATTTCG-TAMRA		



Annexe 2 (suite)

	Genes	Primers names	Primers sequence (5'-3')	Size (bp)	References
Sulfamethoxazol	<i>sul1</i>	qsul1F	CCGTTGGCCTTCTGTAAAG	67	(Heuer and Smalla, 2006)
		qsul1R	TTGCCGATCGCGTGAAGT		
		tpsul1S	FAM-CAGCGAGCCTTGC GGCGG-TAMRA		
Sulfamide	<i>sul2</i>	qsul2F	CGGCTGCGCTTCGATT	60	(Heuer et al., 2008)
		qsul2R	CGCGCGCAGAAAGGATT		
		tpsul2S	FAM-CGGTGCTTCTGTCTGTTTCGCGC-TAMRA		
Quinolone	<i>qnrA</i>	qnrAF	GAGGATTTCTCACGCCAGGAT	111	INRAE <sup>a</sup>
		qnrAR	CTGACAGTGGCTGAAGTCACACT		
		qnrAS	FAM-TGACAGCCGTTTTTCGCCGCTG-TAMRA		
	<i>qnrD</i>	qnrDF	AATCGCTGGAATGGCACTGT	80	INRAE
		qnrDR	AAGACCAATCAAACGATGAAAACCTC		
		qnrDS	FAM-CCGTGTTTCGTGGCTCCGATCTTTC-TAMRA		
Vancomycin	<i>vanA</i>	GE365	CAATAGCGCGGACGAATTGG	145	cette étude
		GE367	GTCCACCTCGCCAACARCTA		
		GE366	FAM- TCGGGCTGTGAGGTCGGTTGTGCGGT-BHQ1		
	<i>vanB</i>	GE356	CATCGCCGTTCCCGAATTC	148	cette étude
		GE358	CGCAGCGTTAAGTCTTCCG		
		GE357	FAM- CCGGAGGCGGGTGCCTTACCTACCC-BHQ1		
Erythromycin	<i>ermQ</i>	GE350	GAAGAGTTAAATYCACCAACTGA	84	cette étude
		GE352	ACTCTCTAGGTATTCCCA		
		GE351	FAM-TGGCTAGTTATGGAGAAAGTTCCGCA-BHQ1		

<sup>a</sup> système développé par l'équipe MERS de l'UMR Agroécologie de INRAE Dijon

**Annexe 3: Abondances absolues (copies gènes / g matière brute) des gènes ciblés dans les lisiers et dans les digestats de chaque condition expérimentale.**

**Abondances absolues des gènes dans les lisiers L1, L2 et L3 pour les TSH de 24, 35 et 46 jours**

Lisier	16S Bact	<i>int1</i>	<i>tetA(P)</i>	<i>tetB(P)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>ermQ</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>
L1	2,8 10 <sup>10</sup>	8,0 10 <sup>8</sup>	2,0 10 <sup>10</sup>	3,7 10 <sup>9</sup>	5,2 10 <sup>9</sup>	8,5 10 <sup>8</sup>	2,5 10 <sup>9</sup>	4,5 10 <sup>8</sup>	1,7 10 <sup>9</sup>	1,9 10 <sup>5</sup>	9,6 0 <sup>5</sup>
L2	1,7 10 <sup>10</sup>	5,2 10 <sup>8</sup>	1,0 10 <sup>10</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	4,1 10 <sup>9</sup>	1,2 10 <sup>9</sup>	1,3 10 <sup>9</sup>	4,1 10 <sup>8</sup>	7,9 10 <sup>8</sup>	< Lq <sup>a</sup>	1,1 10 <sup>6</sup>
L3	7,5 10 <sup>10</sup>	4,8 10 <sup>8</sup>	1,3 10 <sup>10</sup>	1,5 10 <sup>9</sup>	8,0 10 <sup>9</sup>	1,6 10 <sup>9</sup>	1,5 10 <sup>9</sup>	4,8 10 <sup>8</sup>	1,7 10 <sup>9</sup>	2,5 10 <sup>5</sup>	4,6 1 0 <sup>6</sup>

<sup>a</sup> inférieure à la limite de quantification

**Abondances absolues des gènes dans les digestats**

gènes	TSH 24 jours				TSH 35 jours		TSH 46 jours			
	2 <sup>a</sup>		4		3		2		4	
	NT <sup>b</sup>	Th <sup>c</sup>	NT	Th	NT	Th	NT	Th	NT	Th
ADNr 16S	2,1 10 <sup>10</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	2,4 10 <sup>10</sup>	1,5 10 <sup>10</sup>	5,6 10 <sup>10</sup>	5,9 10 <sup>10</sup>	6,2 10 <sup>10</sup>	5,5 10 <sup>10</sup>
écart type	7,1 10 <sup>9</sup>	7,1 10 <sup>8</sup>	5,7 10 <sup>9</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>	8,2 10 <sup>9</sup>	2,7 10 <sup>9</sup>	4,7 10 <sup>9</sup>	3,3 10 <sup>9</sup>	6,2 10 <sup>9</sup>	1,6 10 <sup>8</sup>
<i>int1</i>	1,4 10 <sup>8</sup>	8,3 10 <sup>7</sup>	8,7 10 <sup>7</sup>	3,7 10 <sup>7</sup>	2,4 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>	6,7 10 <sup>8</sup>	1,4 10 <sup>8</sup>	3,0 10 <sup>7</sup>	2,4 10 <sup>7</sup>
écart type	6,0 10 <sup>7</sup>	6,8 10 <sup>6</sup>	2,0 10 <sup>7</sup>	1,7 10 <sup>6</sup>	9,3 10 <sup>7</sup>	1,4 10 <sup>8</sup>	4,3 10 <sup>6</sup>	5,6 10 <sup>6</sup>	1,6 10 <sup>6</sup>	2,7 10 <sup>6</sup>
<i>tetA(P)</i>	4,6 10 <sup>9</sup>	4,7 10 <sup>9</sup>	2,6 10 <sup>9</sup>	3,4 10 <sup>9</sup>	3,2 10 <sup>9</sup>	1,9 10 <sup>9</sup>	3,3 10 <sup>9</sup>	4,2 10 <sup>9</sup>	3,2 10 <sup>9</sup>	2,4 10 <sup>9</sup>
écart type	1,7 10 <sup>9</sup>	7,1 10 <sup>6</sup>	5,2 10 <sup>8</sup>	1,1 10 <sup>9</sup>	5,0 10 <sup>8</sup>	7,7 10 <sup>8</sup>	1,3 10 <sup>9</sup>	5,3 10 <sup>8</sup>	3,3 10 <sup>8</sup>	1,6 10 <sup>8</sup>
<i>tetB(P)</i>	6,7 10 <sup>8</sup>	7,2 10 <sup>8</sup>	3,6 10 <sup>8</sup>	4,6 10 <sup>8</sup>	2,8 10 <sup>8</sup>	1,5 10 <sup>8</sup>	2,7 10 <sup>8</sup>	3,5 10 <sup>8</sup>	1,8 10 <sup>8</sup>	1,1 10 <sup>8</sup>
écart type	2,1 10 <sup>8</sup>	5,2 10 <sup>7</sup>	7,1 10 <sup>7</sup>	1,8 10 <sup>8</sup>	3,2 10 <sup>7</sup>	7,1 10 <sup>7</sup>	1,1 10 <sup>8</sup>	5,7 10 <sup>7</sup>	2,1 10 <sup>7</sup>	2,8 10 <sup>6</sup>
<i>tet(M)</i>	6,5 10 <sup>8</sup>	3,6 10 <sup>8</sup>	3,8 10 <sup>8</sup>	3,3 10 <sup>8</sup>	6,3 10 <sup>8</sup>	3,2 10 <sup>8</sup>	5,6 10 <sup>8</sup>	4,7 10 <sup>8</sup>	4,8 10 <sup>8</sup>	3,4 10 <sup>8</sup>
écart type	4,9 10 <sup>7</sup>	3,2 10 <sup>7</sup>	1,3 10 <sup>8</sup>	9,5 10 <sup>7</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>	1,1 10 <sup>8</sup>	1,5 10 <sup>8</sup>	2,1 10 <sup>6</sup>	2,3 10 <sup>7</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>
<i>tet(A)</i>	8,9 10 <sup>7</sup>	3,4 10 <sup>7</sup>	4,9 10 <sup>7</sup>	2,5 10 <sup>7</sup>	2,1 10 <sup>8</sup>	3,1 10 <sup>7</sup>	1,8 10 <sup>8</sup>	6,3 10 <sup>7</sup>	4,1 10 <sup>7</sup>	1,5 10 <sup>7</sup>
écart type	1,3 10 <sup>7</sup>	9,3 10 <sup>5</sup>	6,5 10 <sup>6</sup>	5,4 10 <sup>6</sup>	2,7 10 <sup>7</sup>	1,2 10 <sup>7</sup>	7,5 10 <sup>7</sup>	1,9 10 <sup>6</sup>	2,1 10 <sup>6</sup>	1,4 10 <sup>6</sup>

**Annexe 3 suite : Abondances absolues des gènes dans les digestats**

gènes	TSH 24 jours				TSH 35 jours		TSH 46 jours			
	2 <sup>a</sup>		4		3		2		4	
	NT <sup>b</sup>	Th <sup>c</sup>	NT	Th	NT	Th	NT	Th	NT	Th
<i>ermQ</i>	4,6 10 <sup>8</sup>	5,4 10 <sup>8</sup>	2,6 10 <sup>8</sup>	3,3 10 <sup>8</sup>	2,6 10 <sup>8</sup>	1,5 10 <sup>8</sup>	2,4 10 <sup>8</sup>	3,0 10 <sup>8</sup>	1,5 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>
écart type	1,8 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>7</sup>	4,7 10 <sup>7</sup>	9,3 10 <sup>7</sup>	2,1 10 <sup>7</sup>	6,3 10 <sup>7</sup>	9,8 10 <sup>7</sup>	5,2 10 <sup>7</sup>	1,6 10 <sup>7</sup>	1,4 10 <sup>7</sup>
<i>sul1</i>	9,3 10 <sup>7</sup>	6,5 10 <sup>7</sup>	8,4 10 <sup>7</sup>	5,9 10 <sup>7</sup>	3,0 10 <sup>8</sup>	1,5 10 <sup>8</sup>	3,0 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>	8,4 10 <sup>7</sup>	1,3 10 <sup>8</sup>
écart type	3,0 10 <sup>7</sup>	1,1 10 <sup>7</sup>	8,0 10 <sup>6</sup>	5,8 10 <sup>6</sup>	8,6 10 <sup>7</sup>	4,2 10 <sup>7</sup>	9,9 10 <sup>7</sup>	2,9 10 <sup>7</sup>	4,4 10 <sup>7</sup>	8,7 10 <sup>6</sup>
<i>sul2</i>	3,1 10 <sup>8</sup>	4,6 10 <sup>8</sup>	6,3 10 <sup>8</sup>	5,3 10 <sup>8</sup>	4,2 10 <sup>8</sup>	2,7 10 <sup>8</sup>	4,5 10 <sup>8</sup>	4,7 10 <sup>8</sup>	5,5 10 <sup>8</sup>	9,9 10 <sup>8</sup>
écart type	1,9 10 <sup>8</sup>	5,6 10 <sup>7</sup>	3,5 10 <sup>8</sup>	7,4 10 <sup>7</sup>	8,4 10 <sup>7</sup>	6,3 10 <sup>7</sup>	2,4 10 <sup>8</sup>	1,1 10 <sup>8</sup>	7,6 10 <sup>7</sup>	2,5 10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup> charge organique (g DCO. L<sup>-1</sup>. j<sup>-1</sup>) ; <sup>b</sup> NT, lisier non traité ; <sup>c</sup> Th, lisier traité thermiquement

**Annexe 4: Matrice de corrélation de Pearson (concentrations en GRA et en gène *int11*) au risque  $\alpha$  de 1%**

	<i>tetA</i> (P)	<i>tetB</i> (P)	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (A)	<i>ermQ</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>int11</i>
<i>tetA</i> (P)	<b>1</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,7</b>	<b>1,0</b>	0,4	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>
<i>tetB</i> (P)		<b>1</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>	0,3	0,5	<b>0,6</b>
<i>tet</i> (M)			<b>1</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>
<i>tet</i> (A)				<b>1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	0,3	<b>0,9</b>
<i>ermQ</i>					<b>1</b>	0,4	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>
<i>sul1</i>						<b>1</b>	0,3	<b>0,8</b>
<i>sul2</i>							<b>1</b>	0,2
<i>int11</i>								<b>1</b>

Les chiffres en gras indiquent une corrélation significative ( $p < 0,01$ )

## **Conclusion générale et perspectives**

---



La méthanisation mésophile agricole voie liquide, actuellement en plein essor, est susceptible de générer un risque sanitaire (dissémination de micro-organismes pathogènes et de l'antibiorésistance) *via* l'épandage des digestats ou des sous-produits issus de cette filière. Les caractéristiques microbiologiques du digestat sont influencées par la qualité sanitaire des effluents entrant dans les unités de méthanisation ainsi que par les conditions du procédé (température du méthaniseur, temps de séjour hydraulique, présence d'un prétraitement thermique en amont du méthaniseur) et la présence de post-traitements des digestats bruts. Le risque sanitaire peut donc être réduit en préservant les animaux d'élevage des agents pathogènes et en limitant les traitements antibiotiques appliqués aux animaux par des bonnes pratiques d'élevage, mais également en agissant sur les paramètres de gestion de la méthanisation.

Dans ce contexte, les travaux de thèse ont porté sur l'impact de la méthanisation mésophile sur la persistance des indicateurs d'efficacité de traitement (*E. coli* et les entérocoques) dont la recherche est stipulée par le règlement européen (UE) N°142/2011 et le cahier des charge CDC Dig, ainsi que sur le devenir *C. perfringens* et de gènes de résistance aux antibiotiques.

Le premier objectif était de comparer les toxinotypes et les profils d'antibiorésistance d'isolats de *C. perfringens* collectés au cours d'une année dans les effluents et les digestats bruts de trois sites de méthanisation agricole. Cette bactérie formant des spores a été sélectionnée en raison de son pouvoir pathogène, de son abondance dans les effluents d'élevage (de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  ufc g<sup>-1</sup>), de son aptitude à se développer en conditions anaérobies mésophiles et de sa capacité de résister à des températures élevées (60-80°C). L'analyse de 157 isolats a montré que la digestion anaérobie mésophile ne modifie pas la distribution des toxinotypes, ceux-ci étant essentiellement représentés par le type A (78,3 % des isolats collectés dans les lisiers et les digestats des trois sites). Alors que le type F (gène *cpe*), impliqué dans des TIAC, n'a pas été mis en évidence dans les trois sites étudiés, il est à noter que des isolats appartenant à ce type ont été retrouvés récemment par Inrae Rennes dans le digestat d'un méthaniseur alimenté par des effluents bovins. Les types C (gène *cpb*), D (gène *etx*) et G (gène *netB*), responsables de maladies chez l'Homme et les animaux d'élevage, ont été retrouvés respectivement dans 3,6, 1,4 et 16,7% des isolats issus des trois sites. La proportion d'isolats portant le gène *cpb2* codant la toxine  $\beta 2$  qui favorise l'aggravation des symptômes gastro-intestinaux, était comprise entre 48 et 80% selon le toxinotype. La mise en évidence des types C, D et G ainsi que du gène *cpb2* dans les digestats montre que la méthanisation ne permet pas d'éliminer les souches responsables d'entérites nécrotiques chez les animaux. De plus, des isolats collectés dans les digestats présentaient une résistance élevée aux antibiotiques utilisés à la fois en médecine vétérinaire et humaine. Le retour au sol de ces digestats est donc préoccupant, *C. perfringens* étant capable de persister dans le sol (Gómez-Brandón *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2017; Scott *et al.*, 2018).

La plupart des gènes de virulence de *C. perfringens* sont portés par des plasmides conjugatifs qui peuvent également héberger des gènes de résistance aux antibiotiques. Il est possible que les isolats très résistants aux antibiotiques aient un génome particulier. Une approche basée sur le séquençage du génome complet d'un panel d'isolats sélectionnés en fonction de leurs gènes de virulence et de leurs profils de résistance aux antibiotiques permettrait de comparer leurs génomes à ceux des isolats incriminés dans les aliments à l'origine de TIAC et d'isolats impliqués dans des maladies animales. Par ailleurs, l'analyse métagénomique permettrait de mieux comprendre les différents mécanismes de résistance des isolats de *C. perfringens* et de décrire les modes de transmission des déterminants de la résistance par l'échange d'EGM.

Le second objectif des travaux de thèse portait sur l'étude de l'impact de trois paramètres de gestion de la méthanisation mésophile (temps de séjour hydraulique, charge organique, prétraitement thermique du lisier de 70°C, 1 heure) sur le devenir de quatre bactéries naturellement présentes dans le lisier : *C. perfringens*, *C. difficile* (autre *Clostridia* pathogène), *E. coli* et les entérocoques. Dans cette étude, menée en pilotes voie liquide alimentés en semi-continu par du lisier de porcs et un co-substrat (aliment broyé pour chevaux), aucun ensemencement n'a été réalisé afin de ne pas introduire un biais associé à la présence de bactéries issues de pré-cultures de laboratoire. Par ailleurs, les temps de séjour hydraulique (TSH), de 24 à 46 jours, ont été sélectionnés afin de tenir compte des contraintes expérimentales tout en se rapprochant des conditions retrouvées sur le terrain. En l'absence de pré-traitement thermique, la digestion anaérobie mésophile a conduit à une diminution de plus de 3 Log<sub>10</sub> des concentrations en *E. coli* et de 0,9 à 2,1 Log<sub>10</sub> des concentrations en entérocoques alors qu'elle n'a eu qu'un très faible impact sur les concentrations en *C. difficile* (0 à 2 Log<sub>10</sub> d'abattement) et en *C. perfringens* (0,1 à 0,6 Log<sub>10</sub> d'abattement) qui ont à peine diminué. L'augmentation du TSH et de la charge, et l'addition du prétraitement thermique du lisier, n'ont pas un impact systématique et celui-ci dépend de la bactérie considérée. Ainsi, seule *E. coli* a été affectée par l'allongement du TSH de 24 à 46 jours qui a conduit à une absence de détection de cette bactérie dans le digestat. L'augmentation de la charge organique de 2 à 4 g DCO.L<sup>-1</sup>. J<sup>-1</sup> a réduit l'abattement des teneurs en entérocoques et en *C. difficile*. Le prétraitement thermique a éliminé *E. coli* et les entérocoques dans le lisier, a réduit de 0,5 à 0,8 Log<sub>10</sub> *C. perfringens*, mais a conduit à une légère augmentation des teneurs en *C. difficile*. Il a été mis en évidence que les entérocoques et les *Clostridia*, en particulier *C. difficile*, considéré comme un pathogène émergent, étaient encore présents dans le digestat à un niveau relativement stable quelles que soient les conditions opératoires, même lorsque le lisier est prétraité thermiquement. L'innocuité du digestat issu d'un méthaniseur mésophile, même avec un prétraitement thermique, ne peut être garantie pour cette bactérie.



Le plan EMAA encourage une approche collective par le regroupement d'exploitations agricoles afin de concevoir des filières de méthanisation dans une logique d'ancrage territorial. Or, l'apport de différents effluents sur un même site de méthanisation accentue le risque sanitaire. Pour cette raison, les autorités sanitaires exigent dans ce cas d'intégrer un prétraitement thermique en amont de la méthanisation. Celui-ci est souvent contesté en raison de son coût et de sa réelle efficacité à hygiéniser les digestats. Il nécessite un investissement supplémentaire (cuve d'hygiénisation) et induit une consommation d'énergie pour chauffer les substrats et garantir le maintien de 70°C pendant 1 h. Dans notre étude, nous avons bien montré que le prétraitement thermique n'avait un effet que sur *E. coli* et donc probablement sur les bactéries à Gram négatif à l'exemple des *Salmonella*, *Yersinia* ou des campylobacters. Par contre, au regard des résultats obtenus sur *C. perfringens*, *C. difficile* et sur les entérocoques, des questions se posent sur la résistance à ce prétraitement d'autres *Clostridia* pathogènes et de bactéries à Gram positif non sporulantes telles que *L. monocytogenes*. Outre le traitement thermique en lui-même, il existe aussi un questionnement sur son positionnement en aval ou en amont du digesteur. Ce positionnement impacte l'efficacité de réduction des micro-organismes pathogènes, la consommation énergétique et la qualité finale du digestat. Selon Coultry *et al.* (2013), le traitement thermique placé au niveau de la post-digestion constitue l'option la plus pertinente d'un point de vue économique. Afin d'améliorer l'efficacité hygiénisante de la méthanisation agricole, certains éleveurs méthaniseurs se questionnent également sur la possibilité de remplacer le prétraitement thermique suivi de la méthanisation mésophile par une méthanisation thermophile qui permettrait de surcroît d'améliorer la production de biogaz.

Des expériences en pilotes fonctionnant en semi-continu pourraient être menées afin de comparer l'impact de la méthanisation thermophile et du traitement thermique de 70°C, 1 h placé avant et après la méthanisation mésophile sur les bactéries non affectées ou peu affectées par le prétraitement thermique dans notre étude : les entérocoques et les *Clostridia* pathogènes.

Une des perspectives serait de mieux comprendre pourquoi les entérocoques sont encore présents dans les digestats alors qu'ils ne sont pas détectés dans le lisier traité thermiquement. Des identifications par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF de 26 isolats issus du lisier (n=10) et des digestats (n=16) des pilotes ont mis en évidence leur appartenance aux espèces *Enterococcus hirae* et *Enterococcus thailandicus*, toutes deux d'origine entérique (Zhong *et al.*, 2017). La présence de faux positifs sur les milieux de culture (milieu de Slanetz puis repiquage sur milieu BEA) ensemencés avec les digestats est donc à exclure. L'hypothèse selon laquelle les entérocoques se multiplient au cours de la méthanisation mésophile est corroborée par des données obtenues sur le terrain. Ainsi, dans le cadre du projet CloDia menée par INRAE Rennes, huit prélèvements de lisier et de digestat ont été effectués au cours d'une année sur le site ayant servi à alimenter les pilotes. Les

résultats des dénombrements montrent une concentration en entérocoques similaire à celle du lisier, parfois supérieure, dans les digestats. La présence des entérocoques dans les digestats alors que ceux-ci ne sont pas détectés dans le lisier traité thermiquement peut être due à un développement des espèces apportées par l'inoculum ayant servi à remplir les pilotes (digestat du site de méthanisation) ou par la croissance d'une population sous-dominante d'entérocoques ayant résisté au traitement thermique. Cette dernière hypothèse pourrait être confirmée par des expériences menées en batch sur du lisier subissant différents couples durées-températures (par exemple, 30 min, 1h et 2h à des températures comprises entre 70 et 80°C) puis stocké à 37°C en anaérobiose, afin de mettre en évidence une éventuelle recroissance des entérocoques, ceux-ci étant identifiés par MALDI-TOF, puis par une analyse de leur génome complet avant et après traitement.

Le troisième objectif des travaux de thèse était d'estimer l'impact des paramètres de gestion de la méthanisation mésophile sur l'antibiorésistance par la recherche de 14 GRA comprenant des gènes de résistance aux tétracyclines, macrolides, sulfamides, pénicillines, polymyxines et quinolones, et de l'intégron de classe 1, EGM largement répandu dans l'environnement. Dans les conditions de l'expérience (pilotes maintenus en mésophilie alimentés en semi continu), la digestion anaérobie réduit les teneurs en GRA mais de façon plus ou moins marquée selon le gène ciblé (0,2 Log<sub>10</sub> pour le gène *sul2* à 2,0 Log<sub>10</sub> pour le gène *tet(A)*). Alors que l'allongement du TSH n'a pas eu d'effet significatif sur l'abattement des concentrations, l'augmentation de la charge organique de 2 à 4 g DCO.L<sup>-1</sup>. J<sup>-1</sup> a augmenté significativement l'abattement des gènes *ermQ*, *tetB(P)*, et *intI1* avec des différences d'abattelements atteignant 0,4, 0,5 et 1,3 Log<sub>10</sub>, respectivement. Seul le gène *tet(A)* a été significativement impacté par le pré-traitement thermique mais la différence d'abattement n'a pas excédé 0,4 Log<sub>10</sub>.

En raison du faible nombre de GRA et d'EGM analysés, les données restent exploratoires. Une analyse du résistome des communautés par analyse métagénomique apporterait des informations sur l'impact des paramètres de gestion de la méthanisation sur la résistance globale. Par ailleurs, le transfert de gènes au cours de la digestion anaérobie est très peu documenté. Des tests de capture de plasmides pourraient donc être effectués afin d'évaluer la capacité de bactéries présentes dans les digestats à transférer par conjugaison des GRA plasmidiques vers des souches receveuses de *E. coli* ou d'entérocoques, en fonction de différentes conditions environnementales (mésophilie vs thermophilie, emplacement du prétraitement thermique en amont ou en aval du digesteur). Des plasmides portés par différentes espèces bactériennes peuvent être détectés après transfert *in vitro* vers une souche receveuse sensible. L'analyse de la résistance aux antibiotiques par méthode culturale permet de mettre en évidence l'acquisition de résistance des transconjugants. Le

séquençage du contenu plasmidique des transconjugants permet ensuite d'identifier les GRA et de caractériser les plasmides qui les portent. Les *Clostridia* étant soupçonnées de participer aux transferts de gènes (Leclercq *et al.*, 2016), il est envisageable de mettre en évidence le transfert de gènes en utilisant des souches de *C. perfringens* dont les GRA ont été identifiés et marqués, puis de les mettre en contact avec les bactéries receveuses à l'exemple des entérocoques (Soge *et al.*, 2009) afin de déterminer la fréquence de transfert dans les différentes conditions citées précédemment. Ces expérimentations pourraient permettre de déterminer les conditions favorisant, ou au contraire limitant, le transfert horizontal de GRA.

Cette étude s'est focalisée sur la 1<sup>ère</sup> étape de la filière de méthanisation agricole et donc sur la qualité sanitaire du digestat brut. Cependant, celui-ci est rarement épandu sur les sols agricoles dans la mesure où il peut être stocké en fosse pendant plusieurs mois ou subir des post-traitements. A titre d'exemple, la filière peut comprendre une post-digestion, une séparation de phase, la phase solide étant ensuite stockée ou compostée, et la phase liquide stockée en fosse. Il est donc important de considérer la filière de méthanisation dans son ensemble en étudiant le devenir des bactéries et des GRA dans les sous-produits destinés à être épandus.



## Références bibliographiques

---



- Adam, K., Evanno, S., 2018. Vers une méthanisation propre, sûre et durable. recueil de bonne pratiques en méthanisation agricole (recueil de bonnes pratiques No. Ineris 17-163622-11458A). INERIS.
- Adams, V., Han, X., Lyras, D., Rood, J.I., 2018. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid* 99, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.07.002>
- Adekunle, K.F., Okolie, J.A., 2015. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *ABB* 06, 205–212. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020>
- Aitken, M.D., Sobsey, M.D., Shehee, M., Blauth, K.E., Hill, V.R., Farrell, J.B., Nappier, S.P., Walters, G.W., Crunk, P.L., Van Abel, N., 2005. Laboratory Evaluation of Thermophilic-Anaerobic Digestion to Produce Class A Biosolids. 2. Inactivation of Pathogens and Indicator Organisms in a Continuous-Flow Reactor Followed by Batch Treatment. *Water Environment Research* 77, 3028–3036. <https://doi.org/10.2175/106143005X73910>
- Alali, W.Q., Thakur, S., Berghaus, R.D., Martin, M.P., Gebreyes, W.A., 2010. Prevalence and Distribution of *Salmonella* in Organic and Conventional Broiler Poultry Farms. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 1363–1371. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0566>
- Albuquerque, J.A., de la Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M., Bernal, M.P., 2012. Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. *Biomass and Bioenergy* 40, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.018>
- Alvarez-Martinez, C.E., Christie, P.J., 2009. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73, 775–808. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-09>
- Alvarez-Perez, S., Blanco, J.L., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., Garcia, M.E., 2009. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Veterinary Microbiology* 137, 302–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.015>
- Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C., Duarte, I., 2019. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae on Portuguese Livestock Manure. *Antibiotics* 8, 23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010023>
- Amani, T.A., Nosrati, M.N., Sreekrishnan, T.R.S.R., 2010. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environmental Reviews*. <https://doi.org/10.1139/A10-011>
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L., 2005. Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* Strains and Relation with Integrons. *AAC* 49, 836–839. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.836-839.2005>

- Arias, D.E., Veluchamy, C., Dunfield, K.E., Habash, M.B., Gilroyed, B.H., 2020. Hygienization and microbial metabolic adaptation during anaerobic co-digestion of swine manure and corn stover. *Bioresource Technology* 306, 123168. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123168>
- Autheman, D., Wyder, M., Popoff, M., D'Herde, K., Christen, S., Posthaus, H., 2013. *Clostridium perfringens* Beta-Toxin Induces Necrostatin-Inhibitible, Calpain-Dependent Necrosis in Primary Porcine Endothelial Cells. *PLOS ONE* 8, e64644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064644>
- Bagge, E., Sahlström, L., Albihn, A., 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research* 39, 4879–4886. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.016>
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance 7.
- Bannam, T.L., Teng, W.L., Bulach, D., Lyras, D., Rood, J.I., 2006. Functional Identification of Conjugation and Replication Regions of the Tetracycline Resistance Plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* 188, 4942–4951. <https://doi.org/10.1128/JB.00298-06>
- Bantwal, R., Bannam, T.L., Porter, C.J., Quinsey, N.S., Lyras, D., Adams, V., Rood, J.I., 2012. The peptidoglycan hydrolase TcpG is required for efficient conjugative transfer of pCW3 in *Clostridium perfringens*. *Plasmid* 67, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.12.016>
- Barth, H., Stiles, B.G., 2008. Binary Actin-ADP-Ribosylating Toxins and their Use as Molecular Trojan Horses for Drug Delivery into Eukaryotic Cells. *Current Medicinal Chemistry* 15, 459–469. <https://doi.org/10.2174/092986708783503195>
- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 100, 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00126-3)
- Ben, W., Wang, J., Pan, X., Qiang, Z., 2017. Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China. *Chemosphere* 167, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.013>
- Beneragama, N., Iwasaki, M., Lateef, S.A., Yamashiro, T., Ihara, I., Umetsu, K., 2013. The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Animal Science Journal* 84, 426–433. <https://doi.org/10.1111/asj.12017>
- Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clinical Infectious Diseases* 57, 425–433. <https://doi.org/10.1093/cid/cit244>



- Bhatty, M., Laverde Gomez, J.A., Christie, P.J., 2013. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology* 164, 620–639. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
- Bi, S., Hong, X., Yang, H., Yu, X., Fang, S., Bai, Y., Liu, J., Gao, Y., Yan, L., Wang, W., Wang, Y., 2020. Effect of hydraulic retention time on anaerobic co-digestion of cattle manure and food waste. *Renewable Energy* 150, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.091>
- Bi, S., Qiao, W., Xiong, L., Ricci, M., Adani, F., Dong, R., 2019. Effects of organic loading rate on anaerobic digestion of chicken manure under mesophilic and thermophilic conditions. *Renewable Energy* 139, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.083>
- Billington, S.J., Wieckowski, E.U., Sarker, M.R., Bueschel, D., Songer, J.G., McClane, B.A., 1998. *Clostridium perfringens* Type E Animal Enteritis Isolates with Highly Conserved, Silent Enterotoxin Gene Sequences. *Infect Immun* 66, 4531–4536.
- Bingen, E., 2005. Résistance du streptocoque du groupe A aux macrolides. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 18, 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.jpp.2005.09.010>
- Binh, C.T.T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., Smalla, K., 2008. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids: Transferable antibiotic resistance plasmids in manure. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 25–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00526.x>
- Bokori-Brown, M., Savva, C.G., Costa, S.P.F. da, Naylor, C.E., Basak, A.K., Titball, R.W., 2011. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *The FEBS Journal* 278, 4589–4601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x>
- Bonetta, Si., Ferretti, E., Bonetta, Sa., Fezia, G., Carraro, E., 2011. Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products: Microbial contamination of digestate. *Letters in Applied Microbiology* 53, 552–557. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03148.x>
- Bonneau, M., Dourmad, J.Y., Germon, J.C., Hassouna, M., Leuret, B., Loyon, L., Paillat, J.M., Ramonet, Y., Robin, P., 2008. Connaissance des émissions gazeuses dans les différentes filières de gestion des effluents porcins. *INRA Prod. Anim.* 21, 345–360. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2008.21.4.3410>
- Brauer, A., Telling, K., Laht, M., Kalmus, P., Lutsar, I., Remm, M., Kisand, V., Tenson, T., 2016. Plasmid with Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Pig Slurry in Estonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6933–6936. <https://doi.org/10.1128/AAC.00443-16>
- Brynstad, S., Synstad, B., Granum, P.E., 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains 7.

- Buffiere, P., Bayard, R., Germain, P., 2009. Freins et développements de la filière biogaz : les besoins en recherche et développement (No. 07-0418/1A).
- Burch, T.R., Spencer, S.K., Borchardt, S.S., Larson, R.A., Borchardt, M.A., 2018. Fate of Manure-Borne Pathogens during Anaerobic Digestion and Solids Separation. *Journal of Environment Quality* 47, 336. <https://doi.org/10.2134/jeq2017.07.0285>
- Burton, C.H., Turner, C., 2003. Manure management - Treatment strategies for sustainable agriculture.
- Busato, A., hofer, D., Lentze, T., Gaillard, C., Burnens, A., 1999. Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. *Veterinary Microbiology* 69, 251–263. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00119-4)
- Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Kay, P., Boxall, A.B.A., Hawkey, P.M., Wellington, E.M.H., 2009. Prevalence of Sulfonamide Resistance Genes in Bacterial Isolates from Manured Agricultural Soils and Pig Slurry in the United Kingdom. *AAC* 53, 696–702. <https://doi.org/10.1128/AAC.00652-07>
- Callaway, T.R., Keen, J.E., Edrington, T.S., Baumgard, L.H., Spicer, L., Fonda, E.S., Griswold, K.E., Overton, T.R., VanAmburgh, M.E., Anderson, R.C., Genovese, K.J., Poole, T.L., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2005. Fecal Prevalence and Diversity of *Salmonella* Species in Lactating Dairy Cattle in Four States. *Journal of Dairy Science* 88, 3603–3608. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73045-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73045-9)
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J.M., 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research* 41, 2139–2150. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.012>
- Carrère, H., Bougrier, C., Castets, D., Delgenès, J.P., 2008. Impact of initial biodegradability on sludge anaerobic digestion enhancement by thermal pretreatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 43, 1551–1555. <https://doi.org/10.1080/10934520802293735>
- Cavalcanti, M.T.H., Porto, T., Porto, A.L.F., Brandi, I.V., Lima Filho, J.L. de, Pessoa Junior, A., 2004. Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: a review. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40, 151–164. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000200004>
- Cavinato, C., 2011. Anaerobic digestion fundamentals I. [http://www.valorgas.soton.ac.uk/Pub\\_docs/JyU%20SS%202013/VALORGAS\\_JyU\\_2013\\_Lecture%201.pdf](http://www.valorgas.soton.ac.uk/Pub_docs/JyU%20SS%202013/VALORGAS_JyU_2013_Lecture%201.pdf)
- Cavinato, C., Da Ros, C., Pavan, P., Bolzonella, D., 2017. Influence of temperature and hydraulic retention on the production of volatile fatty acids during anaerobic fermentation of cow manure and maize silage. *Bioresource Technology* 223, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.041>

- Chah, K.F., Ugwu, I.C., Okpala, A., Adamu, K.Y., Alonso, C.A., Ceballos, S., Nwanta, J.N., Torres, C., 2018. Detection and molecular characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enteric bacteria from pigs and chickens in Nsukka, Nigeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 15, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.06.002>
- Chan, G., Farzan, A., Soltes, G., Nicholson, V.M., Pei, Y., Friendship, R., Prescott, J.F., 2012. The epidemiology of *Clostridium perfringens* type A on Ontario swine farms, with special reference to *cpb2*-positive isolates. *BMC Vet Res* 8, 156. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-156>
- Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., Waksman, G., 2009. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* 462, 1011–1015. <https://doi.org/10.1038/nature08588>
- Chen, J.L., Ortiz, R., Steele, T.W.J., Stuckey, D.C., 2014. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. *Biotechnology Advances* 32, 1523–1534. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.005>
- Chen, Q.-L., An, X.-L., Li, H., Zhu, Y.-G., Su, J.-Q., Cui, L., 2017. Do manure-borne or indigenous soil microorganisms influence the spread of antibiotic resistance genes in manured soil? *Soil Biology and Biochemistry* 114, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.07.022>
- Chen, Y., Fu, B., Wang, Y., Jiang, Q., Liu, H., 2012. Reactor performance and bacterial pathogen removal in response to sludge retention time in a mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. *Bioresource Technology* 106, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.093>
- Chen, Z., Ding, W., Xu, Y., Müller, C., Rütting, T., Yu, H., Fan, J., Zhang, J., Zhu, T., 2015. Importance of heterotrophic nitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in a cropland soil: Evidences from a  $^{15}\text{N}$  tracing study to literature synthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 91, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.026>
- Chiapetta, H., Harrison, J., Gay, J., McClanahan, R., Whitefield, E., Evermann, J., Nennich, T., Gamroth, M., 2019. Reduction of Pathogens in Bovine Manure in Three Full-scale Commercial Anaerobic Digesters. *Water Air Soil Pollut* 230, 111. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4163-4>
- Chinivasagam, H.N., Thomas, R.J., Casey, K., McGahan, E., Gardner, E.A., Rafiee, M., Blackall, P.J., 2004. Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in the south east Queensland region of Australia. *Journal of Applied Microbiology* 97, 883–891. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02382.x>
- Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A.V., Bergeron, J., Retsema, J.A., 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology* 22, 867–879. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.01521.x>

- Coelho, J.J., Prieto, M.L., Dowling, S., Hennessy, A., Casey, I., Woodcock, T., Kennedy, N., 2018. Physical-chemical traits, phytotoxicity and pathogen detection in liquid anaerobic digestates. *Waste Management* 78, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.017>
- Coelho, N.M.G., Droste, R.L., Kennedy, K.J., 2011. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Research* 45, 2822–2834. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.032>
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E., 1994. The Phylogeny of the Genus *Clostridium* : Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 812–826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
- Costa, A., Gusmara, C., Gardoni, D., Zaninelli, M., Tambone, F., Sala, V., Guarino, M., 2017. The effect of anaerobic digestion and storage on indicator microorganisms in swine and dairy manure. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 24135–24146. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0011-5>
- Côté, C., Massé, D.I., Quessy, S., 2006. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresource Technology* 97, 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.024>
- Coultry, J., Walsh, E., McDonnell, K.P., 2013. Energy and economic implications of anaerobic digestion pasteurisation regulations in Ireland. *Energy* 60, 125–128. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2013.07.059>
- Cruz-Morales, P., Orellana, C.A., Moutafis, G., Moonen, G., Rincon, G., Nielsen, L.K., Marcellin, E., 2019. Revisiting the Evolution and Taxonomy of *Clostridia*, a Phylogenomic Update. *Genome Biology and Evolution* 11, 2035–2044. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz096>
- Dahms, C., Hübner, N.-O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K., Kramer, A., 2015. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLOS ONE* 10, e0143326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143326>
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Davis, C.A., Janssen, E.M.-L., 2020. Environmental fate processes of antimicrobial peptides daptomycin, bacitracins, and polymyxins. *Environment International* 134, 105271. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105271>
- De Jong, A.E.I., Beumer, R.R., Rombouts, F.M., 2002. Optimizing Sporulation of *Clostridium perfringens*. *Journal of Food Protection* 65, 1457–1462. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.9.1457>

- Deguchi, A., Miyamoto, K., Kuwahara, T., Miki, Y., Kaneko, I., Li, J., McClane, B.A., Akimoto, S., 2009. Genetic Characterization of Type A Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Strains. PLoS ONE 4, e5598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005598>
- Degueurce, A., Trémier, A., Peu, P., 2016. Dynamic effect of leachate recirculation on batch mode solid state anaerobic digestion: Influence of recirculated volume, leachate to substrate ratio and recirculation periodicity. Bioresource Technology 216, 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.113>
- Delfosse, P., 2011. Microbiologie de la digestion anaérobie (rapport technique). Centre de Recherche Publique Gabriel Lippmann, Luxembourg.
- Dennehy, C., Lawlor, P.G., McCabe, M.S., Cormican, P., Sheahan, J., Jiang, Y., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018. Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics. Waste Management 71, 532–541. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.047>
- Diab, S.S., 2016. Diseases Produced by *Clostridium perfringens* Type C, in: *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 143–155. <https://doi.org/10.1002/9781118728291.ch12>
- Diehl, D.L., LaPara, T.M., 2010. Effect of Temperature on the Fate of Genes Encoding Tetracycline Resistance and the Integrase of Class 1 Integrons within Anaerobic and Aerobic Digesters Treating Municipal Wastewater Solids. Environ. Sci. Technol. 44, 9128–9133. <https://doi.org/10.1021/es102765a>
- Dijkstra, A.J., Keck, W., 1996. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. Journal of Bacteriology 178, 5555–5562. <https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5555-5562.1996>
- Dorca-Arévalo, J., Pauillac, S., Díaz-Hidalgo, L., Martín-Satué, M., Popoff, M.R., Blasi, J., 2014. Correlation between In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Lethal Activity in Mice of Epsilon Toxin Mutants from *Clostridium perfringens*. PLOS ONE 9, e102417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102417>
- Doublet, S., Leclerc, B., Couturier, C., Berger, S., Schubetzer, C., 2004. Agronomical quality of digestates. Final report-December 2014; La qualite agronomique des digestats. Rapport Final-Decembre 2004.
- Duan, M., Zhang, Y., Zhou, B., Wang, Q., Gu, J., Liu, G., Qin, Z., Li, Z., 2019. Changes in antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during cattle manure composting after inoculation with *Bacillus subtilis*. Bioresource Technology 292, 122011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122011>
- Dungan, R.S., Strausbaugh, C.A., Leytem, A.B., 2019. Survey of selected antibiotic resistance genes in agricultural and non-agricultural soils in south-central Idaho. FEMS Microbiology Ecology 95, fiz071. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz071>

- EFSA, 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal 17, e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Englen, M.D., Hill, A.E., Dargatz, D.A., Ladely, S.R., Fedorka-Cray, P.J., 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. J Appl Microbiol 102, 1570–1577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03189.x>
- Erkan, M., Sanin, F.D., 2013. Can sludge dewatering reactivate microorganisms in mesophilically digested anaerobic sludge? Case of belt filter versus centrifuge. Water Research 47, 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.028>
- Esteban, J.I., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R.A., Hurtado, A., 2008. A survey of food-borne pathogens in free-range poultry farms. International Journal of Food Microbiology 123, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.012>
- Finnie, J.W., 1984. Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. Journal of comparative pathology 94, 363–370.
- Fohler, S., Klein, G., Hoedemaker, M., Scheu, T., Seyboldt, C., Campe, A., Jensen, K.C., Abdulmawjood, A., 2016a. Diversity of *Clostridium perfringens* toxin-genotypes from dairy farms. BMC Microbiology 16. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0812-6>
- Fohler, S., Klein, G., Hoedemaker, M., Scheu, T., Seyboldt, C., Campe, A., Jensen, K.C., Abdulmawjood, A., 2016b. Diversity of *Clostridium perfringens* toxin-genotypes from dairy farms. BMC Microbiology 16. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0812-6>
- Freedman, J., Shrestha, A., McClane, B., 2016. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. Toxins 8, 73. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>
- Freedman, J.C., Theoret, J.R., Wisniewski, J.A., Uzal, F.A., Rood, J.I., McClane, B.A., 2015. *Clostridium perfringens* type A–E toxin plasmids. Research in Microbiology 166, 264–279. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.004>
- Fröschle, B., Heiermann, M., Lebuhn, M., Messelhäusser, U., Plöchl, M., 2015. Hygiene and Sanitation in Biogas Plants, in: Guebitz, G.M., Bauer, A., Bochmann, G., Gronauer, A., Weiss, S. (Eds.), Biogas Science and Technology. Springer International Publishing, Cham, pp. 63–99. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-21993-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-21993-6_3)
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nature Reviews Microbiology 3, 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- Gaillot, B., Lavarde, patrick, 2015. Les épandages sur terres agricoles des matières fertilisantes d'origine résiduaire Mission prospective sur les modalités d'encadrement et de suivi réglementaire (No. CGEDD n°009801-1, CGAAER n°14074). CGEDD, CGAAER.
- Gao, T., Tong, Y., Cao, M., Li, X., Pang, X., 2013. Evaluation of the inactivation of human Coxsackievirus by thermophilic and mesophilic anaerobic digestion using integrated cell

- culture and reverse transcription real-time quantitative PCR. *Water Research* 47, 4259–4264. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.046>
- Gao, Y., Lu, C., Shen, D., Liu, J., Ma, Z., Yang, B., Ling, W., 2019. Elimination of the risks of colistin resistance gene (*mcr-1*) in livestock manure during composting. *Environment International* 8.
- Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., Ollivier, B., 2000. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6, 205–226. <https://doi.org/10.1006/anae.2000.0345>
- Ghosh, S., Ramsden, S.J., LaPara, T.M., 2009. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 84, 791–796. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2125-2>
- Gibert, M., Jolivet-Renaud, C., Popoff, M.R., 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203, 65–73. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00493-9)
- Gniadkowski, M., 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection* 7, 597–608. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00330.x>
- Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., Grohmann, E., 2013. Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid* 70, 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.09.005>
- Gómez-Brandón, M., Juárez, M.F.-D., Zangerle, M., Insam, H., 2016. Effects of digestate on soil chemical and microbiological properties: A comparative study with compost and vermicompost. *Journal of Hazardous Materials* 302, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.067>
- Goossens, E., Valgaeren, B.R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P.R., Van Immerseel, F., 2017. Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Veterinary Research* 48, 9. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0413-x>
- Gothwal, R., Shashidhar, T., 2015. Antibiotic Pollution in the Environment: A Review: Antibiotic Pollution in the Environment. *CLEAN - Soil, Air, Water* 43, 479–489. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>
- Goulas, A., Livoreil, B., Grall, N., Benoit, P., Couderc-Obert, C., Dagot, C., Patureau, D., Petit, F., Laouénan, C., Andremont, A., 2018. What are the effective solutions to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review protocol. *Environ Evid* 7, 3. <https://doi.org/10.1186/s13750-018-0118-2>
- Gros, M., Marti, E., Balcázar, J.L., Boy-Roura, M., Busquets, A., Colón, J., Sánchez-Melsió, A., Lekunberri, I., Borrego, C.M., Ponsá, S., Petrovic, M., 2019. Fate of pharmaceuticals and

- antibiotic resistance genes in a full-scale on-farm livestock waste treatment plant. *Journal of Hazardous Materials* 378, 120716. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.109>
- Gu, G., Strawn, L.K., Zheng, J., Reed, E.A., Rideout, S.L., 2019. Diversity and Dynamics of *Salmonella enterica* in Water Sources, Poultry Litters, and Field Soils Amended With Poultry Litter in a Major Agricultural Area of Virginia. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02868>
- Guenther, S., Falgenhauer, L., Semmler, T., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Roesler, U., Roschanski, N., 2017. Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *J. Antimicrob. Chemother.* dkw585. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw585>
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X., He, P., 2020. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11, 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>
- Guo, T., Lou, C., Zhai, W., Tang, X., Hashmi, M.Z., Murtaza, R., Li, Y., Liu, X., Xu, J., 2018. Increased occurrence of heavy metals, antibiotics and resistance genes in surface soil after long-term application of manure. *Science of The Total Environment* 635, 995–1003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.194>
- Gurjar, A., Li, J., McClane, B.A., 2010. Characterization of Toxin Plasmids in *Clostridium perfringens* Type C Isolates. *Infect. Immun.* 78, 4860–4869. <https://doi.org/10.1128/IAI.00715-10>
- Gurjar, A.A., Hegde, N.V., Love, B.C., Jayarao, B.M., 2008. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxotyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Molecular and Cellular Probes* 22, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.08.001>
- Gurmessa, B., Pedretti, E.F., Cocco, S., Cardelli, V., Corti, G., 2020. Manure anaerobic digestion effects and the role of pre- and post-treatments on veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes removal efficiency. *Science of The Total Environment* 721, 137532. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137532>
- Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M., Lucena, F., 2007. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids: Indicator and pathogens in sludges. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2420–2429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x>
- Hamza, D., Dorgham, S.M., Elhariri, M., Elhelw, R., Ismael, E., 2018. New insight of apparently healthy animals as a potential reservoir for *Clostridium perfringens*: a public health implication. *Journal of Veterinary Research* 62, 457–462. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0073>
- Han, X.-M., Hu, H.-W., Chen, Q.-L., Yang, L.-Y., Li, H.-L., Zhu, Y.-G., Li, X.-Z., Ma, Y.-B., 2018. Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures. *Soil Biology and Biochemistry* 126, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.018>



- Harikishan, S., Sung, S., 2003. Cattle waste treatment and Class A biosolid production using temperature-phased anaerobic digester. *Advances in Environmental Research, Sludge Management Entering the 3rd. Millennium* 7, 701–706. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00034-5)
- Harkness, J.M., Li, J., McClane, B.A., 2012. Identification of a lambda toxin-negative *Clostridium perfringens* strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly. *Anaerobe* 18, 546–552. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.001>
- Hattori, S., 2008. Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments. *Microb. Environ.* 23, 118–127. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.118>
- He, L.-Y., Liu, Y.-S., Su, H.-C., Zhao, J.-L., Liu, S.-S., Chen, J., Liu, W.-R., Ying, G.-G., 2014. Dissemination of Antibiotic Resistance Genes in Representative Broiler Feedlots Environments: Identification of Indicator ARGs and Correlations with Environmental Variables. *Environ. Sci. Technol.* 10.
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., Alvarez, P.J.J., 2020. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *NPJ Clean Water* 3, 11.
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K., 2011a. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology* 14, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>
- Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleineidam, K., Schloter, M., Muller, T., Focks, A., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., 2011b. Accumulation of Sulfonamide Resistance Genes in Arable Soils Due to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 4.
- Higgins, M.J., Chen, Y.-C., Murthy, S.N., Hendrickson, D., Farrel, J., Schafer, P., 2007. Reactivation and growth of non-culturable indicator bacteria in anaerobically digested biosolids after centrifuge dewatering. *Water Research* 41, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.017>
- Himathongkham, S., Riemann, H., Bahari, S., Nuanualsuwan, S., Kass, P., Cliver, D.O., 2000. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in Poultry Manure and Manure Slurry at Sublethal Temperatures. *Avian Diseases* 44, 853. <https://doi.org/10.2307/1593057>
- Hölzel, C., Bauer, J., 2008. *Salmonella* spp. in Bavarian Liquid Pig Manure: Occurrence and Relevance for the Distribution of Antibiotic Resistance. *Zoonoses Public Health* 55, 133–138. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01102.x>
- Houot, S., Pons, M.-N., Pradel, M., Caillaud, M., Tibi, A., 2014. Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier. Impacts agronomiques, environnementaux, socio-économiques. (Rapport d'expertise scientifique collective, Inra-CNRS-Irstea). INRA-CNRS-IRSTEA, FRANCE.

- Huang, I.-H., Raju, D., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., 2007. *Clostridium perfringens* : Sporulation, spore resistance and germination. *Bangladesh Journal of Microbiology* 24, 1–8.
- Huang, I.-H., Waters, M., Grau, R.R., Sarker, M.R., 2004. Disruption of the gene ( *spo0A* ) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiology Letters* 233, 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09487.x>
- Hupfauf, S., Winkler, A., Wagner, A.O., Podmirseg, S.M., Insam, H., 2020. Biomethanation at 45 °C offers high process efficiency and supports hygienisation. *Bioresource Technology* 300, 122671. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122671>
- Jacoby, G.A., 2006.  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1123–1129. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1123-1129.2006>
- Jacoby, G.A., Strahilevitz, J., Hooper, D.C., 2020. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Microbiol. Spectr* 24.
- Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., Rupnik, M., 2016. Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. *PLOS ONE* 11, e0167101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167101>
- Jean, D., Briolat, V., Reyssset, G., 2004. Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*. *Microbiology* 150, 1649–1659. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27017-0>
- Ji, X., Shen, Q., Liu, F., Ma, J., Xu, G., Wang, Y., Wu, M., 2012. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. *Journal of Hazardous Materials* 235–236, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.040>
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A., Brinkman, F.S.L., Wright, G.D., McArthur, A.G., 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research* 45, D566–D573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>
- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., Zhu, C., 2019. Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01787>
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z., Yang, Q., McCarthy, G., Tan, S.P., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018a. Inactivation of *Salmonella* during dry co-digestion of food waste and pig manure. *Waste Management* 82, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.037>

- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018b. Inactivation of enteric indicator bacteria and system stability during dry co-digestion of food waste and pig manure. *Science of The Total Environment* 612, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.214>
- Jiang, Y., Xie, S.H., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z.H., Wu, G.X., Zhan, X.M., Gardiner, G.E., 2020. Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 120, 109654. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109654>
- Johanesen, P.A., Lyras, D., Bannam, T.L., Rood, J.I., 2001a. Transcriptional Analysis of the *tet(P)* Operon from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 183, 7110–7119. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7110-7119.2001>
- Johanesen, P.A., Lyras, D., Rood, J.I., 2001b. Induction of pCW3-Encoded Tetracycline Resistance in *Clostridium perfringens* Involves a Host-Encoded Factor. *Plasmid* 46, 229–232. <https://doi.org/10.1006/plas.2001.1543>
- Johansson, A., Greko, C., Engström, B.E., Karlsson, M., 2004. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology* 99, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.009>
- Jost, B.H., Trinh, H.T., Songer, J.G., 2006. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology* 116, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.025>
- Joy, S.R., Bartelt-Hunt, S.L., Snow, D.D., Gilley, J.E., Woodbury, B.L., Parker, D.B., Marx, D.B., Li, X., 2013. Fate and transport of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in soil and runoff following land application of swine manure slurry. *Environ Sci Technol* 47, 12081–12088. <https://doi.org/10.1021/es4026358>
- Joy, S.R., Li, X., Snow, D.D., Gilley, J.E., Woodbury, B., Bartelt-Hunt, S.L., 2014. Fate of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in simulated swine manure storage. *Science of The Total Environment* 481, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.027>
- Kather, E.J., Marks, S.L., Foley, J.E., 2006. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 113, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.021>
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I., Moore, R.J., 2008. NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens* 4, e26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>
- Kunte, D.P., Yeole, T.Y., Ranade, D.R., 2000. Effect of volatile fatty acids on *Shigella dysenteriae* during anaerobic digestion of human night soil 4.

- Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., Ben Moussa, M., 2014. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Médecine et Maladies Infectieuses* 44, 400–404. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.03.010>
- Lau, C.H.-F., Li, B., Zhang, T., Tien, Y.-C., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Lapen, D.R., Duenk, P., Topp, E., 2017. Impact of pre-application treatment on municipal sludge composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of The Total Environment* 587–588, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.123>
- Le Maréchal, C., Druilhe, C., Repérant, E., Boscher, E., Rouxel, S., Le Roux, S., Poëzévara, T., Ziebal, C., Houdayer, C., Nagard, B., Barbut, F., Pourcher, A., Denis, M., 2019. Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants. *MicrobiologyOpen* 8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.872>
- Le Maréchal, C., Gateau, C., Poezevara, T., Couturier, J., Rouxel, S., Syed Zaidi, R., Houard, E., Pourcher, A.-M., Denis, M., Barbut, F., 2020. Characterization of *Clostridioides difficile* strains isolated from manure and digestate in five agricultural biogas plants. *Anaerobe* 62, 102180. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102180>
- Leclercq, S.O., Wang, C., Sui, Z., Wu, H., Zhu, B., Deng, Y., Feng, J., 2016. A multiplayer game: species of *Clostridium*, *Acinetobacter*, and *Pseudomonas* are responsible for the persistence of antibiotic resistance genes in manure-treated soils: Antibiotic resistance genes in manure-treated soils. *Environmental Microbiology* 18, 3494–3508. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13337>
- Lee, Jangwoo, Shin, S.G., Jang, H.M., Kim, Y.B., Lee, Joonyeob, Kim, Y.M., 2017. Characterization of antibiotic resistance genes in representative organic solid wastes: Food waste-recycling wastewater, manure, and sewage sludge. *Science of The Total Environment* 579, 1692–1698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.187>
- Lee, S., Mir, R.A., Park, S.H., Kim, D., Kim, H.-Y., Boughton, R.K., Morris, J.G., Jeong, K.C., 2020. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the local farm environment and livestock: challenges to mitigate antimicrobial resistance. *Critical Reviews in Microbiology* 46, 1–14. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1715339>
- Lei, Z., Zhi, L., Jiang, H., Chen, R., Wang, X., Li, Y.-Y., 2019. Characterization of microbial evolution in high-solids methanogenic co-digestion of canned coffee processing wastewater and waste activated sludge by an anaerobic membrane bioreactor. *Journal of Cleaner Production* 232, 1442–1451. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.045>
- Létourneau, V., Duchaine, C., Côté, C., Letellier, A., Topp, E., Massé, D., 2010. Presence of zoonotic pathogens in physico-chemically characterized manures from hog finishing houses using different production systems. *Bioresource Technology* 101, 4048–4055. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.009>

- Li, J., Adams, V., Bannam, T.L., Miyamoto, K., Garcia, J.P., Uzal, F.A., Rood, J.I., McClane, B.A., 2013. Toxin Plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77, 208–233. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00062-12>
- Li, J., McClane, B.A., 2006. Further Comparison of Temperature Effects on Growth and Survival of *Clostridium perfringens* Type A Isolates Carrying a Chromosomal or Plasmid-Borne Enterotoxin Gene. *AEM* 72, 4561–4568. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-06>
- Li, J., Miyamoto, K., McClane, B.A., 2007a. Comparison of Virulence Plasmids among *Clostridium perfringens* Type E Isolates. *Infect Immun* 75, 1811–1819. <https://doi.org/10.1128/IAI.01981-06>
- Li, J., Paredes-Sabja, D., Mahfuzur R., S., McClane, B.A., 2016. *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production, in: Driks, Eichenberger, P. (Eds.), *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*. American Society of Microbiology, pp. 331–347. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015>
- Li, J., Sayeed, S., McClane, B.A., 2007b. Prevalence of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) Area Soils and Home Kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7218–7224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01075-07>
- Li, Z., Wu, X., Zhou, B., Wang, Yan, Sun, Y., Wang, Yanfang, Chen, Z., Zhang, J., 2019. Effect of one step temperature increment from mesophilic to thermophilic anaerobic digestion on the linked pattern between bacterial and methanogenic communities. *Bioresource Technology* 292, 121968. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121968>
- Lima, T., Domingues, S., Da Silva, G.J., 2020. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary Sciences* 7, 110. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030110>
- Lima, T., Domingues, S., Silva, G.J.D., 2019. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms* 55, 17.
- Lin, H., Chapman, S.J., Freitag, T.E., Kyle, C., Ma, J., Yang, Y., Zhang, Z., 2019. Fate of tetracycline and sulfonamide resistance genes in a grassland soil amended with different organic fertilizers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 170, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.059>
- Lindström, M., Heikinheimo, A., Lahti, P., Korkeala, H., 2011. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiology* 28, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.020>
- Lloret, E., Pastor, L., Pradas, P., Pascual, J.A., 2013a. Semi full-scale thermophilic anaerobic digestion (TAnD) for advanced treatment of sewage sludge: Stabilization process and pathogen reduction. *Chemical Engineering Journal* 232, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.062>

- Lloret, E., Salar, M.J., Blaya, J., Pascual, J.A., 2013b. Two-stage mesophilic anaerobic–thermophilic digestion for sludge sanitation to obtain advanced treated sludge. *Chemical Engineering Journal* 230, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.066>
- López, A., Rodríguez-Chueca, J., Mosteo, R., Gómez, J., Ormad, M.P., 2020. Microbiological quality of sewage sludge after digestion treatment: A pilot scale case of study. *Journal of Cleaner Production* 254, 120101. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120101>
- Lucey, B.P., Hutchins, G.M., 2004. William H. Welch, MD, and the Discovery of *Bacillus welchii*. *Arch Pathol Lab Med* 128, 3.
- Lund, B., Jensen, V.F., Have, P., Ahring, B., 1996. Inactivation of virus during anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 25–31. <https://doi.org/10.1007/BF00641608>
- Luo, G., Li, B., Li, L.-G., Zhang, T., Angelidaki, I., 2017. Antibiotic Resistance Genes and Correlations with Microbial Community and Metal Resistance Genes in Full-Scale Biogas Reactors As Revealed by Metagenomic Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4069–4080. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05100>
- Luste, S., Heinonen-Tanski, H., Luostarinen, S., 2012. Co-digestion of dairy cattle slurry and industrial meat-processing by-products – Effect of ultrasound and hygienization pre-treatments. *Bioresource Technology* 104, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.003>
- Ma, J., Gu, J., Wang, X., Peng, H., Wang, Q., Zhang, R., Hu, T., Bao, J., 2019. Effects of nano-zerovalent iron on antibiotic resistance genes during the anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology* 289, 121688. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121688>
- Ma, Y., Wilson, C.A., Novak, J.T., Riffat, R., Aynur, S., Murthy, S., Pruden, A., 2011. Effect of Various Sludge Digestion Conditions on Sulfonamide, Macrolide, and Tetracycline Resistance Genes and Class I Integrons. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7855–7861. <https://doi.org/10.1021/es200827t>
- Manyi-Loh, C.E., Mamphweli, S.N., Meyer, E.L., Okoh, A.I., Makaka, G., Simon, M., 2014. Inactivation of Selected Bacterial Pathogens in Dairy Cattle Manure by Mesophilic Anaerobic Digestion (Balloon Type Digester). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 7184–7194. <https://doi.org/10.3390/ijerph110707184>
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G., 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 45, 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Topp, E., 2013. Impact of Manure Fertilization on the Abundance of Antibiotic-Resistant Bacteria and Frequency of Detection of Antibiotic Resistance Genes in Soil and on Vegetables at Harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5701–5709. <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13>

- Martín-Burriel, I., Andrés-Lasheras, S., Harders, F., Mainar-Jaime, R.C., Ranera, B., Zaragoza, P., Falceto, V., Bolea, Y., Kuijper, E., Bolea, R., Bossers, A., Chirino-Trejo, M., 2017. Molecular analysis of three *Clostridium difficile* strain genomes isolated from pig farm-related samples. *Anaerobe* 48, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.09.002>
- Massé, D., Gilbert, Y., Topp, E., 2011. Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresource Technology* 102, 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.020>
- Maus, I., Bremges, A., Stolze, Y., Hahnke, S., Cibis, K.G., Koeck, D.E., Kim, Y.S., Kreubel, J., Hassa, J., Wibberg, D., Weimann, A., Off, S., Stantscheff, R., Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., König, H., Liebl, W., Scherer, P., McHardy, A.C., Sczyrba, A., Klocke, M., Pühler, A., Schlüter, A., 2017. Genomics and prevalence of bacterial and archaeal isolates from biogas-producing microbiomes. *Biotechnol Biofuels* 10, 264. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0947-1>
- McAllister, T.A., Topp, E., 2012. Role of livestock in microbiological contamination of water: Commonly the blame, but not always the source. *Animal Frontiers* 2, 17–27. <https://doi.org/10.2527/af.2012-0039>
- McCarthy, G., Lawlor, P.G., Gutierrez, M., Gardiner, G.E., 2013. Assessing the biosafety risks of pig manure for use as a feedstock for composting. *Science of The Total Environment* 463–464, 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.069>
- McKinney, C.W., Loftin, K.A., Meyer, M.T., Davis, J.G., Pruden, A., 2010. *tet* and *sul* Antibiotic Resistance Genes in Livestock Lagoons of Various Operation Type, Configuration, and Antibiotic Occurrence. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6102–6109. <https://doi.org/10.1021/es9038165>
- McLaughlin, M.R., Brooks, J.P., Adeli, A., 2009. Characterization of Selected Nutrients and Bacteria from Anaerobic Swine Manure Lagoons on Sow, Nursery, and Finisher Farms in the Mid-South USA. *J. Environ. Qual.* 38, 2422–2430. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0468>
- Menardo, S., Gioelli, F., Balsari, P., 2011. The methane yield of digestate: Effect of organic loading rate, hydraulic retention time, and plant feeding. *Bioresource Technology* 102, 2348–2351. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.094>
- Menz, J., Olsson, O., Kümmerer, K., 2019. Antibiotic residues in livestock manure: Does the EU risk assessment sufficiently protect against microbial toxicity and selection of resistant bacteria in the environment? *Journal of Hazardous Materials* 379, 120807. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120807>
- Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier Gros Claude, J.-D., Timinouni, M., 2011. Résistance aux quinolones de types *qnr*, *aac* (6′)-*lb-cr* chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie, Numero Mediterranee* 59, e73–e78. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.05.003>

- Merlin, C., Toussaint, A., 1999. Les éléments transposables bactériens. Société Française de Génétique 15.
- Mir, R.A., Weppelmann, T.A., Johnson, J.A., Archer, D., Jr, J.G.M., Jeong, K.C., 2016. Identification and Characterization of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle. PLOS ONE 11, e0163279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163279>
- Mir, R.A., Weppelmann, T.A., Teng, L., Kirpich, A., Elzo, M.A., Driver, J.D., Jeong, K.C., 2018. Colonization Dynamics of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle Raised Without Cephalosporin Antibiotics. Front. Microbiol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00500>
- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J., Frear, C., 2013. The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion. Bioresource Technology 149, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.048>
- Miyamoto, K., Yumine, N., Mimura, K., Nagahama, M., Li, J., McClane, B.A., Akimoto, S., 2011. Identification of Novel *Clostridium perfringens* Type E Strains That Carry an Iota Toxin Plasmid with a Functional Enterotoxin Gene. PLOS ONE 6, e20376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020376>
- Moletta, R., 2011. La méthanisation, 2e édition. ed. Lavoisier.
- Monturiol-Gross, L., Flores-Diaz, M., Araya-Castillo, C., Pineda-Padilla, M.-J., Clark, G.C., Titball, R.W., Alape-Giron, A., 2012. Reactive Oxygen Species and the MEK/ERK Pathway Are Involved in the Toxicity of *Clostridium perfringens* Toxin, a Prototype Bacterial Phospholipase C. Journal of Infectious Diseases 206, 1218–1226. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis496>
- Morris, W.E., Fernández-Miyakawa, M.E., 2009. Toxinas de *Clostridium perfringens*. Revista Argentina de Microbiología 11.
- Morris, W.E., Goldstein, J., Redondo, L.M., Cangelosi, A., Geoghegan, P., Brocco, M., Loidl, F.C., Fernandez-Miyakawa, M.E., 2017. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces permanent neuronal degeneration and behavioral changes. Toxicon 130, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.019>
- Moset, V., Poulsen, M., Wahid, R., Højberg, O., Møller, H.B., 2015. Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: methane productivity and microbial ecology. Microbial Biotechnology 8, 787–800. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12271>
- Nagpal, R., Ogata, K., Tsuji, H., Matsuda, K., Takahashi, T., Nomoto, K., Suzuki, Y., Kawashima, K., Nagata, S., Yamashiro, Y., 2015. Sensitive quantification of *Clostridium perfringens* in human feces by quantitative real-time PCR targeting alpha-toxin and enterotoxin genes. BMC Microbiology 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0561-y>
- Navarro, M.A., McClane, B.A., Uzal, F.A., 2018. Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins. Toxins 10, 212. <https://doi.org/10.3390/toxins10050212>



- Naylor, C.E., Eaton, J.T., Howells, A., Justin, N., Moss, D.S., Titball, R.W., Basak, A.K., 1998. Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nature Structural & Molecular Biology* 5, 738–746. <https://doi.org/10.1038/1447>
- Nowell, V.J., Poppe, C., Parreira, V.R., Jiang, Y.-F., Reid-Smith, R., Prescott, J.F., 2010. *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaerobe* 16, 314–315. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.11.004>
- Oda, M., Terao, Y., Sakurai, J., Nagahama, M., 2015. Membrane-Binding Mechanism of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. *Toxins* 7, 5268–5275. <https://doi.org/10.3390/toxins7124880>
- Oliver, J.P., Gooch, C.A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J.J., Sassoubre, L., Crossette, E.M., Aga, D.S., 2020. Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of Dairy Science* 103, 1051–1071. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16778>
- Oosterkamp, M.J., Méndez-García, C., Kim, C.-H., Bauer, S., Ibáñez, A.B., Zimmerman, S., Hong, P.-Y., Cann, I.K., Mackie, R.I., 2016. Lignocellulose-derived thin stillage composition and efficient biological treatment with a high-rate hybrid anaerobic bioreactor system. *Biotechnol Biofuels* 9, 120. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0532-z>
- Orzi, V., Scaglia, B., Lonati, S., Riva, C., Boccasile, G., Alborali, G.L., Adani, F., 2015. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Science of The Total Environment* 526, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.038>
- Ottoson, J., Nordin, A., von Rosen, D., Vinnerås, B., 2008. *Salmonella* reduction in manure by the addition of urea and ammonia. *Bioresource Technology* 99, 1610–1615. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.009>
- Palanichamy, J., Palani, S., 2014. Simulation of anaerobic digestion processes using stochastic algorithm. *J Environ Health Sci Engineer* 12, 121. <https://doi.org/10.1186/s40201-014-0121-7>
- Palmisano, A.C., Barlaz, M.A., 1996. *Microbiology of solid waste*. CRC press.
- Pandey, P.K., Cao, W., Wang, Y., Vaddella, V., Castillo, A.R., Souza, A., Rio, N.S. del, 2016. Simulating the effects of mesophilic anaerobic and aerobic digestions, lagoon system, and composting on pathogen inactivation. *Ecological Engineering* 97, 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.047>
- Pandey, P.K., Soupir, M.L., 2011. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express* 1, 18. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>
- Parker, M.W., Feil, S.C., 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88, 91–142. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>

- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. null 21, 411–490. <https://doi.org/10.1080/10643389109388424>
- Perreten, V., Boerlin, P., 2003. A New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. AAC 47, 1169–1172. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends in Microbiology 7, 104–110. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01430-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01430-9)
- Pigeon, S., 2010. Guide des technologies de traitement de lisier de porc. Fédération des producteurs de porcs du Quebec.
- Popoff, M.R., 2011. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. The FEBS Journal 278, 4602–4615. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x>
- Popoff, M.R., Bouvet, P., 2013. Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution. Toxicon 75, 63–89. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.003>
- Popova, T.P., Zaharinov, B., Kaleva, M.D., Baykov, B.D., Shindarska, Z., 2013. Reduction of microorganisms in thermophilic process of anaerobic digestion of cattle manure. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2, 653–660.
- Porter, C.J., Bantwal, R., Bannam, T.L., Rosado, C.J., Pearce, M.C., Adams, V., Lyras, D., Whisstock, J.C., Rood, J.I., 2012. The conjugation protein TpcC from *Clostridium perfringens* is structurally related to the type IV secretion system protein VirB8 from Gram-negative bacteria: Structure and function of TpcC. Molecular Microbiology 83, 275–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07930.x>
- Pourcher, A.-M., Ziebal, C., Kervarrec, M., Bioteau, T., Dabert, P., 2012. Sanitary Status of 44 Hog Manures in Brittany: Comparison of the Effectiveness of Manure Treatments Based on the Levels of Indicator Bacteria and Two Pathogenic Bacteria. Journal of Agricultural Science and Technology (JAST), 3, pp.303-313.
- Prescott, J.F., MacInnes, J.I., Wu, A.K.K., 2016. Taxonomic Relationships among the *Clostridia*, in: *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1002/9781118728291.ch1>
- Qi, G., Pan, Z., Sugawa, Y., Andriamanohiarisoamanana, F.J., Yamashiro, T., Iwasaki, M., Kawamoto, K., Ihara, I., Umetsu, K., 2018. Comparative fertilizer properties of digestates from mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of dairy manure: focusing on plant growth promoting bacteria (PGPB) and environmental risk. J Mater Cycles Waste Manag 20, 1448–1457. <https://doi.org/10.1007/s10163-018-0708-7>
- Qian, X., Gu, J., Sun, W., Wang, X.-J., Su, J.-Q., Stedfeld, R., 2018. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following

- industrial composting. *Journal of Hazardous Materials* 344, 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.020>
- Resende, J.A., Silva, V.L., de Oliveira, T.L.R., de Oliveira Fortunato, S., da Costa Carneiro, J., Otenio, M.H., Diniz, C.G., 2014. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology* 153, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.007>
- Revitt-Mills, S.A., Rood, J.I., Adams, V., 2015. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiol. Aust.* <https://doi.org/10.1071/MA15039>
- Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 245, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>
- Robertson, S.L., Li, J., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2011. Evidence for a Prepore Stage in the Action of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin. *PLOS ONE* 6, e22053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022053>
- Rodriguez, C., Hakimi, D.-E., Vanleyssem, R., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M., Korsak, N., Daube, G., 2017. *Clostridium difficile* in beef cattle farms, farmers and their environment: Assessing the spread of the bacterium. *Veterinary Microbiology* 210, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.010>
- Romano, V., Pasquale, V., Lemee, L., El Meouche, I., Pestel-Caron, M., Capuano, F., Buono, P., Dumontet, S., 2018. *Clostridioides difficile* in the environment, food, animals and humans in southern Italy: Occurrence and genetic relatedness. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 59, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.08.006>
- Rood, J.I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B.A., Melville, S.B., Moore, R.J., Popoff, M.R., Sarker, M.R., Songer, J.G., Uzal, F.A., Van Immerseel, F., 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
- Rosenblum, J., Bisesi, M., Castano, J., Tamkin, A., Ciotola, R., Lee, J., Martin, J., 2015. Influence of seasonal fluctuation and loading rates on microbial and chemical indicators during semi-continuous anaerobic digestion. *Environmental Technology* 36, 1308–1318. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.986537>
- Rossolini, G.M., D’Andrea, M.M., Mugnaioli, C., 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x>
- Rounsefell, B.D., O’Sullivan, C.A., Chinivasagam, N., Batstone, D., Clarke, W.P., 2012. Fate of pathogen indicators in a domestic blend of food waste and wastewater through a two-stage anaerobic digestion system. *Water Science & Technology* 67, 366. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.573>

- Sahlström, L., 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology* 6.
- Sakurai, J., 2004. *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin: Characterization and Mode of Action. *Journal of Biochemistry* 136, 569–574. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh161>
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M., Tsuge, H., Kobayashi, K., 2009. *Clostridium perfringens* Iota-Toxin: Structure and Function. *Toxins* 1, 208–228. <https://doi.org/10.3390/toxins1020208>
- Saliu, E.-M., Vahjen, W., Zentek, J., 2017. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. *Animal Health Research Reviews* 18, 46–57. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000020>
- Salminen, E.A., Rintala, J.A., 2002. Semi-continuous anaerobic digestion of solid poultry slaughterhouse waste: effect of hydraulic retention time and loading. *Water Research* 36, 3175–3182. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00010-6)
- Salsali, H., Parker, W.J., Sattar, S.A., 2008. The effect of volatile fatty acids on the inactivation of *Clostridium perfringens* in anaerobic digestion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 659–665. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9514-4>
- Salsali, H.R., Parker, W.J., Sattar, S.A., 2006. Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 279–286. <https://doi.org/10.1139/w05-125>
- Savva, C.G., Fernandes da Costa, S.P., Bokori-Brown, M., Naylor, C.E., Cole, A.R., Moss, D.S., Titball, R.W., Basak, A.K., 2013. Molecular Architecture and Functional Analysis of NetB, a Pore-forming Toxin from *Clostridium perfringens*. *J. Biol. Chem.* 288, 3512–3522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430223>
- Sayeed, S., Li, J., McClane, B.A., 2007. Virulence Plasmid Diversity in *Clostridium perfringens* Type D Isolates. *Infect. Immun.* 75, 2391–2398. <https://doi.org/10.1128/IAI.02014-06>
- Scaglia, B., D'Imporzano, G., Garuti, G., Negri, M., Adani, F., 2014. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Science of The Total Environment* 466–467, 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.114>
- Schauss, T., Glaeser, S.P., Gütschow, A., Dott, W., Kämpfer, P., 2015. Improved Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* in Input and Output Samples of German Biogas Plants by a Selective Pre-Enrichment Procedure. *PLOS ONE* 10, e0119791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119791>
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.-D., Wehland, J., Aktories, K., 2009. *Clostridium difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLOS Pathogens* 5, e1000626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000626>

- Scott, A., Tien, Y.-C., Drury, C.F., Reynolds, W.D., Topp, E., 2018. Enrichment of antibiotic resistance genes in soil receiving composts derived from swine manure, yard wastes, or food wastes, and evidence for multiyear persistence of swine *Clostridium* spp. *Can. J. Microbiol.* 64, 201–208. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0642>
- Semenov, A.V., Franz, E., Overbeek, L.V., Termorshuizen, A.J., Bruggen, A.H.C.V., 2008. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157:H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environmental Microbiology* 10, 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01558.x>
- Seo, B., Jeon, K., Baek, I., Lee, Y.M., Baek, K., Ko, G., 2021. *Clostridium fessum* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004579>
- Shin, S.W., Jung, M., Won, H.G., Belaynehe, K.M., Yoon, I.J., Yoo, H.S., 2017. Characteristics of Transmissible CTX-M- and CMY-Type  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates Collected from Pig and Chicken Farms in South Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 1716–1723. <https://doi.org/10.4014/jmb.1610.10006>
- Shrestha, A., McClane, B.A., 2013. Human Claudin-8 and -14 Are Receptors Capable of Conveying the Cytotoxic Effects of *Clostridium perfringens* Enterotoxin. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00594-12>
- Skillman, L.C., Bajsa, O., Ho, L., Santhanam, B., Kumar, M., Ho, G., 2009. Influence of high gas production during thermophilic anaerobic digestion in pilot-scale and lab-scale reactors on survival of the thermotolerant pathogens *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* in piggery wastewater. *Water Research* 43, 3281–3291. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.031>
- Soge, O.O., Tivoli, L.D., Meschke, J.S., Roberts, M.C., 2009. A conjugative macrolide resistance gene, *mef(A)*, in environmental *Clostridium perfringens* carrying multiple macrolide and/or tetracycline resistance genes. *Journal of Applied Microbiology* 106, 34–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03960.x>
- Song, W., Wang, X., Jie Gu, Zhang, S., Yin, Y., Li, Y., Xun Qian, Wei, S., 2017. Effects of different swine manure to wheat straw ratios on antibiotic resistance genes and the microbial community structure during anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 8.
- Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., da Silva Heck, T.M., da Luz, R.B., Fabres, R.B., Soliman, M.C., Rigotto, C., Baldasso, N.A., Spilki, F.R., de Matos Almeida, S.E., 2015. Animal and human enteric viruses in water and sediment samples from dairy farms. *Agricultural Water Management* 152, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.01.010>
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>

- Steen, J.A., Bannam, T.L., Teng, W.L., Devenish, R.J., Rood, J.I., 2009. The Putative Coupling Protein TcpA Interacts with Other pCW3-Encoded Proteins To Form an Essential Part of the Conjugation Complex. *Journal of Bacteriology* 191, 2926–2933. <https://doi.org/10.1128/JB.00032-09>
- Stiles, B.G., Barth, G., Barth, H., Popoff, M.R., 2013. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man? *Toxins* 5, 2138–2160. <https://doi.org/10.3390/toxins5112138>
- Stiles, B.G., Wigelsworth, D.J., Popoff, M.R., Barth, H., 2011. *Clostridial* Binary Toxins: Iota and C2 Family Portraits. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00011>
- Stone, J.J., Clay, S.A., Zhu, Z., Wong, K.L., Porath, L.R., Spellman, G.M., 2009. Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion. *Water Research* 43, 4740–4750. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.005>
- Sun, W., Gu, J., Wang, X., Qian, X., Peng, H., 2019. Solid-state anaerobic digestion facilitates the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements from cattle manure. *Bioresource Technology* 274, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.013>
- Sun, W., Qian, X., Gu, J., Wang, X.-J., Duan, M.-L., 2016. Mechanism and Effect of Temperature on Variations in Antibiotic Resistance Genes during Anaerobic Digestion of Dairy Manure. *Scientific Reports* 9.
- Teng, W.L., Bannam, T.L., Parsons, J.A., Rood, J.I., 2008. Functional Characterization and Localization of the TcpH Conjugation Protein from *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* 190, 5075–5086. <https://doi.org/10.1128/JB.00386-08>
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., Schlüter, A., 2003. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 239–252. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00164-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00164-8)
- Theoret, J.R., McClane, B.A., 2016. Toxins of *Clostridium perfringens*, in: *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 45–60. <https://doi.org/10.1002/9781118728291.ch5>
- Thevenin, N., Benbrahim, M., Bacholle, C., Fuchs, J., Zdanevitch, I., Marcovecchio, F., Durable, C., Angers, D., 2011. Qualité agronomique et sanitaire des digestats-octobre 2011.
- Thurston-Enriquez, J.A., Gilley, J.E., Eghball, B., 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. *Journal of Water and Health* 3, 157–171. <https://doi.org/10.2166/wh.2005.0015>
- Tien, Y.-C., Li, B., Zhang, T., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Marti, R., Topp, E., 2017. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest.

- Titball, R.W., Naylor, C.E., Basak, A.K., 1999. The *Clostridium perfringens* a-toxin. *Anaerobe* 5, 51–64.
- Trochard, R., Généromont, S., Loubet, B., 2019. EVAPRO: Evaluation des pertes d'azote par Volatilisation Ammoniacale suite à l'épandage de Produits Résiduaire Organiques (expertises).
- Turner, N.A., Smith, B.A., Lewis, S.S., 2019. Novel and emerging sources of Clostridioides difficile infection. *PLOS Pathogens* 15, e1008125. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008125>
- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N.A., Handelsman, J., 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 15202–15207.
- Uzal, F.A., Freedman, J.C., Shrestha, A., Theoret, J.R., Garcia, J., Awad, M.M., Adams, V., Moore, R.J., Rood, J.I., McClane, B.A., 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiology* 9, 361–377. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.168>
- Uzal, F.A., Navarro, M.A., Li, J., Freedman, J.C., Shrestha, A., McClane, B.A., 2018. Comparative pathogenesis of enteric *Clostridial* infections in humans and animals. *Anaerobe* 53, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.06.002>
- Uzal, F.A., Songer, J.G., Prescott, J.F., Popoff, M.R., 2016. *Clostridial* Diseases of Animals. John Wiley & Sons.
- Uzal, F.A., Vidal, J.E., McClane, B.A., Gurjar, A.A., 2010. *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxinology J* 2, 24–42.
- Van Asten, A.J.A.M., Nikolaou, G.N., Gröne, A., 2010. The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the  $\beta$ 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *The Veterinary Journal* 183, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.11.005>
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van den Meersche, T., Rasschaert, G., Haesebrouck, F., Van Coillie, E., Herman, L., Van Weyenberg, S., Daeseleire, E., Heyndrickx, M., 2019. Presence and fate of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and zoonotic bacteria during biological swine manure treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 175, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.127>

- Van Overbeek, L.S., van Doorn, J., Wichers, J.H., van Amerongen, A., van Roermund, H.J.W., Willemsen, P.T.J., 2014. The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00104>
- Vaneckhaute, C., 2017. Nutrient Recovery from Digestate: Systematic Technology Review and Product Classification 20.
- Varel, V.H., Wells, J.E., Shelver, W.L., Rice, C.P., Armstrong, D.L., Parker, D.B., 2012. Effect of anaerobic digestion temperature on odour, coliforms and chlortetracycline in swine manure or monensin in cattle manure\*. *Journal of Applied Microbiology* 112, 705–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05250.x>
- Veshnyakova, A., Protze, J., Rossa, J., Blasig, I.E., Krause, G., Piontek, J., 2010. On the Interaction of *Clostridium perfringens* Enterotoxin with Claudins. *Toxins* 2, 1336–1356. <https://doi.org/10.3390/toxins2061336>
- Villa, T.G., Feijoo-Siota, L., Sánchez-Pérez, A., Rama, J.L.R., Sieiro, C., 2019. Horizontal Gene Transfer in Bacteria, an Overview of the Mechanisms Involved, in: Villa, Tomás G., Viñas, M. (Eds.), *Horizontal Gene Transfer: Breaking Borders Between Living Kingdoms*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–76. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21862-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21862-1_1)
- Wallace, J.S., Garner, Emily, Pruden, A., Aga, D.S., 2018. Occurrence and transformation of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes in dairy manure treated by advanced anaerobic digestion and conventional treatment methods. *Environmental Pollution* 9.
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., Zong, Z., 2020. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections* 9, 508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
- Wang, N., Guo, X., Yan, Z., Wang, W., Chen, B., Ge, F., Ye, B., 2016. A Comprehensive Analysis on Spread and Distribution Characteristic of Antibiotic Resistance Genes in Livestock Farms of Southeastern China. *PLoS ONE* 11, e0156889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156889>
- Wang, N., Yang, X., Jiao, S., Zhang, J., Ye, B., Gao, S., 2014. Sulfonamide-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Soils Fertilized with Manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PLoS ONE* 9, e112626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112626>
- Watcharasukarn, M., Kaparaju, P., Steyer, J.-P., Krogfelt, K.A., Angelidaki, I., 2009. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants. *Microb Ecol* 58, 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9497-9>
- Waters, M., Savoie, A., Garmory, H.S., Bueschel, D., Popoff, M.R., Songer, J.G., Titball, R.W., McClane, B.A., Sarker, M.R., 2003. Genotyping and Phenotyping of Beta2-Toxigenic *Clostridium perfringens* Fecal Isolates Associated with Gastrointestinal Diseases in Piglets. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3584–3591. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3584-3591.2003>



- Wichmann, F., Udikovic-Kolic, N., Andrew, S., Handelsman, J., 2014. Diverse Antibiotic Resistance Genes in Dairy Cow Manure 5, 9.
- Wijnands, L.M., van der Mey-Florijn, A., Delfgou-van Asch, E.H.M., 2011. *Clostridium perfringens* associated with food borne disease. RIVM report 330371005.
- Wioland, L., Dupont, J.-L., Bossu, J.-L., Popoff, M.R., Poulain, B., 2013. Attack of the nervous system by *Clostridium perfringens* Epsilon toxin: From disease to mode of action on neural cells. *Toxicon* 75, 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.003>
- Wolters, B., Ding, G.-C., Kreuzig, R., Smalla, K., 2016a. Full-scale mesophilic biogas plants using manure as C-source: bacterial community shifts along the process cause changes in the abundance of resistance genes and mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology* fiv163. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv163>
- Wolters, B., Widyasari-Mehta, A., Kreuzig, R., Smalla, K., 2016b. Contaminations of organic fertilizers with antibiotic residues, resistance genes, and mobile genetic elements mirroring antibiotic use in livestock? *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 9343–9353. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7742-y>
- Wu, J., Hu, Y., Wang, S., Cao, Z., Li, H., Fu, X.-M., Wang, K., Zuo, J., 2017. Effects of thermal treatment on high solid anaerobic digestion of swine manure: Enhancement assessment and kinetic analysis. *Waste Management* 62, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.022>
- Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Jensen, L.B., 2010. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet Scand* 52, 47. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>
- Xia, X., Wang, Z., Fu, Y., Du, X., Gao, B., Zhou, Y., He, J., Wang, Y., Shen, J., Jiang, H., Wu, Y., 2019. Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of *mcr-1* gene in swine feedlots. *Environment International* 127, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.061>
- Xiao, Y., Wagendorp, A., Moezelaar, R., Abee, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2012. A Wide Variety of *Clostridium perfringens* Type A Food-Borne Isolates That Carry a Chromosomal *cpe* Gene Belong to One Multilocus Sequence Typing Cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7060–7068. <https://doi.org/10.1128/AEM.01486-12>
- Xu, R., Zhang, K., Liu, P., Khan, A., Xiong, J., Tian, F., Li, X., 2018. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology* 247, 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.095>
- Zhang, J., Chen, M., Sui, Q., Wang, R., Tong, J., Wei, Y., 2018. Fate of antibiotic resistance genes and its drivers during anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge based on

- microwave pretreatment. *Bioresource Technology* 217, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.140>
- Zhang, J., Wang, Z., Lu, T., Liu, J., Wang, Y., Shen, P., Wei, Y., 2019. Response and mechanisms of the performance and fate of antibiotic resistance genes to nano-magnetite during anaerobic digestion of swine manure. *Journal of Hazardous Materials* 366, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.106>
- Zhang, L., Loh, K.-C., Zhang, J., 2019. Jointly reducing antibiotic resistance genes and improving methane yield in anaerobic digestion of chicken manure by feedstock microwave pretreatment and activated carbon supplementation. *Chemical Engineering Journal* 372, 815–824. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.207>
- Zhang, Y., Snow, D.D., Parker, D., Zhou, Z., Li, X., 2013. Intracellular and Extracellular Antimicrobial Resistance Genes in the Sludge of Livestock Waste Management Structures. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10206–10213. <https://doi.org/10.1021/es401964s>
- Zheng, B., Huang, C., Xu, H., Guo, L., Zhang, J., Wang, X., Jiang, X., Yu, X., Jin, L., Li, X., Feng, Y., Xiao, Y., Li, L., 2017. Occurrence and Genomic Characterization of ESBL-Producing, MCR-1-Harboring *Escherichia coli* in Farming Soil. *Front. Microbiol.* 8, 2510. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02510>
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H., Sun, Z., 2017. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research* 196, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.009>
- Zhu, Y.-G., Johnson, T.A., Su, J.-Q., Qiao, M., Guo, G.-X., Stedtfeld, R.D., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>
- Zhu-Barker, X., Cavazos, A.R., Ostrom, N.E., Horwath, W.R., Glass, J.B., 2015a. The importance of abiotic reactions for nitrous oxide production. *Biogeochemistry* 126, 251–267. <https://doi.org/10.1007/s10533-015-0166-4>
- Zhu-Barker, X., Doane, T.A., Horwath, W.R., 2015b. Role of green waste compost in the production of N<sub>2</sub>O from agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.008>
- Zou, Y., Xiao, Y., Fang, T., Dong, P., 2020. New insight into fates of sulfonamide and tetracycline resistance genes and resistant bacteria during anaerobic digestion of manure at thermophilic and mesophilic temperatures. *Journal of Hazardous Materials* 9.

## **Annexe**

---



**Annexe 1: Prévalence (%) de bactéries pathogènes recherchées dans les lisiers et fumiers porcins, bovins et volailles.**

Origine	Références	Nb élevages	<i>Salmonella</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>E. coli</i> O157	campylobacters thermotolérants	<i>L. monocytogenes</i>
porcin	Côté <i>et al.</i> (2006)	32	<b>37</b>	<b>9</b>	-	-	- <sup>a</sup>
	Bhaduri <i>et al.</i> (2005)	77	-	<b>53</b>	-	-	-
	Farzan <i>et al.</i> (2010)	31	<b>77</b>	<b>18</b>	-	-	<b>27</b>
	Hölzel et Bauer, (2008)	380	<b>1,6</b>	-	-	-	-
	Watabe <i>et al.</i> (2003)	14	<b>71,4</b>	<b>0</b>	-	-	-
	Chinivasagam <i>et al.</i> (2004)	13	<b>31</b>	-	-	<b>84,6</b>	-
	Pourcher <i>et al.</i> (2012)	44	<b>50</b>	-	-	-	<b>18</b>
	Létourneau <i>et al.</i> (2010)	11	<b>54,5</b>	<b>91</b>	-	-	-
	McLaughlin <i>et al.</i> (2009)	37	<b>89</b>	-	-	-	-
	McCarthy <i>et al.</i> (2013)	30	<b>50</b>	-	-	-	-
	Hutchison <i>et al.</i> (2004)	126	-	-	-	<b>11,9</b>	-
	Rodriguez <i>et al.</i> (2006)	18	<b>57,3</b>	-	-	-	-
	Orzi <i>et al.</i> (2015)	6	<b>33,3</b>	<b>33,3</b>	<b>0</b>	-	<b>33,3</b>
bovin	Lailler <i>et al.</i> (2005)	489	<b>7,2</b>	-	-	-	-
	Blau <i>et al.</i> (2005)	97	<b>30,9</b>	-	-	-	-
	Murinda <i>et al.</i> (2002)	30	<b>25,3</b>	-	-	-	-
	Callaway <i>et al.</i> (2005)	16	<b>56</b>	-	-	-	-
	Vilar <i>et al.</i> (2010)	89	-	-	-	<b>36</b>	-
	Englen <i>et al.</i> (2007)	94	-	-	-	<b>97,9</b>	-
	Wesley <i>et al.</i> (2000)	31	-	-	-	<b>80,6</b>	-
	Busato <i>et al.</i> 1999)	67	-	-	<b>43</b>	<b>32</b>	-
	Schouten <i>et al.</i> (2005)	462	-	-	<b>9,1</b>	-	-
	Gunn <i>et al.</i> (2007)	952	-	-	<b>21,7</b>	-	-
	Franz <i>et al.</i> (2007)	25	-	-	<b>52</b>	-	-
	Souillard <i>et al.</i> (2015)	5	-	-	-	-	-
	Chen <i>et al.</i> (2019)	13	<b>6,6</b>	-	<b>15,4</b>	-	-
	Orzi <i>et al.</i> (2015)	2	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	-	-
Baker <i>et al.</i> (2019)	11	-	-	<b>19</b>	-	-	
volaille	Esteban <i>et al.</i> (2008)	34	<b>2,9</b>	-	-	<b>25,5</b>	<b>26,5</b>
	Aury <i>et al.</i> (2010)	302	<b>15,6</b>	-	-	-	-
	Huneau-Salaün <i>et al.</i> (2009)	519	<b>17,9</b>	-	-	-	-
	Santos <i>et al.</i> (2005)	12	<b>100</b>	-	-	-	-
	Rodriguez <i>et al.</i> (2006)	18	<b>16,2</b>	-	-	-	-
	Alali <i>et al.</i> (2010)	7	<b>38,8</b>	-	-	-	-
	Van Hoorebeke <i>et al.</i> (2009)	19	-	-	-	-	-
	Schouten <i>et al.</i> (2005)	429	-	-	<b>0,5</b>	-	-
	Gu <i>et al.</i> (2019)	3	<b>26,9</b>	-	-	-	-
	Gutierrez <i>et al.</i> (2020)	18	<b>61,1</b>	-	-	-	-

<sup>a</sup> non recherché



**Titre :** Impact de la méthanisation agricole mésophile voie liquide sur le devenir de *Clostridia* pathogènes et de gènes de résistance aux antibiotiques.

**Mots clés :** digestion anaérobie mésophilie, paramètres de gestion, prétraitement thermique, *C. perfringens*, pathogènes, gènes de résistances aux antibiotiques.

Garantir l'innocuité des digestats lors de leur retour au sol représente un enjeu important pour la filière de méthanisation agricole. Le 1<sup>er</sup> objectif de la thèse était d'estimer à l'échelle du terrain, l'impact de trois méthaniseurs mésophiles sur la virulence et l'antibiorésistance de *C. perfringens*, bactérie pathogène, anaérobie stricte, susceptible de se développer dans les méthaniseurs. La digestion anaérobie n'a pas modifié la répartition des toxintypes, majoritairement représentés par le type A (78,3% des isolats) ni les profils d'antibiorésistance. Plusieurs isolats étaient très résistants aux antibiotiques utilisés en médecine humaine, notamment la vancomycine et l'imipénem. Le 2<sup>nd</sup> objectif était d'évaluer sur des pilotes mésophiles semi-continus, l'effet du temps de séjour hydraulique (TSH), de la charge organique et du prétraitement thermique (70°C, 1h) du lisier alimentant les pilotes sur (i) quatre bactéries (*E. coli*, entérocoques, *C. perfringens* et *C. difficile*), (ii) les communautés microbiennes et (iii) 14 gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) et le gène *int1*.

Le paramètre ayant le plus d'influence sur les bactéries est le prétraitement thermique. Il permet d'éliminer *E. coli* dans les digestats et de diminuer d'un facteur 10 les teneurs en *C. perfringens*, mais il conduit à une légère augmentation des teneurs en *C. difficile* dans le lisier alimentant les réacteurs. S'il permet d'éliminer les entérocoques dans le lisier, ceux-ci sont encore présents dans les digestats suggérant leur développement dans les pilotes inoculés avec un digestat lors de leur mise en route. La méthanisation mésophile modifie la composition des communautés bactériennes en augmentant l'abondance relative des *Bacteroidetes* et en diminuant celle des Firmicutes. Elle réduit les teneurs en GRA à un degré plus ou moins marqué selon le gène considéré (de 0,1 à 2 Log<sub>10</sub>). L'allongement du TSH ainsi que le prétraitement thermique diminuent le nombre d'OTU mais n'impactent pas significativement l'abattement des teneurs en GRA et en gène *int1*.

**Title :** Impact of liquid mesophilic anaerobic digestion on the fate of pathogenic *Clostridia* and antibiotic resistance genes.

**Keywords :** Mesophilic anaerobic digestion, operational parameters, heat pretreatment, *C. perfringens*, pathogens, antibiotic resistance genes.

It is important to guarantee the safe use of digestate for land application. The first objective of this work was to estimate, at field scale, the impact of three mesophilic digesters on the virulence and on the antibiotic resistance of *C. perfringens*, a pathogenic, strictly anaerobic bacterium which may grow in digesters. Anaerobic digestion did not change the distribution of the toxinotypes, mostly represented by type A (78.3% of the isolates), nor the antimicrobial resistance profiles of the isolates. Some isolates were highly resistant to antibiotics used in human medicine, especially vancomycin and imipenem. The second objective was to evaluate on semi-continuous mesophilic pilots, the effect of hydraulic retention time (HRT), organic loading rate and pretreatment of manure (70 °C, 1 h), on (i) four bacteria (*E. coli*, enterococci, *C. perfringens* and *C. difficile*), (ii) microbial communities and (iii) 14 antibiotic resistance genes (ARG) and the gene *int1*.

The thermal pre-treatment had the greatest effect on the four bacteria: *E. coli* was not detected in digestates and the level of *C. perfringens* was reduced by a factor of 10. However it led to a slight increase in the level of *C. difficile* in the manure. Although no enterococci were detected in the heated manure, they were still present in the digestates, suggesting their ability to grow in the pilots inoculated with a digestate at the beginning of each experiment. Mesophilic anaerobic digestion changed the composition of bacterial communities by increasing the relative abundance of *Bacteroidetes* and decreasing the abundance of Firmicutes. The process reduced the concentration of the ARG (the Log reduction ranged from 0.1 to 2). The increasing of the HRT and the application of the thermal pretreatment led to a reduction in the number of OTU but did not significantly impact the Log reduction of the ARG and of the gene *int1*.