



**HAL**  
open science

# Digestion anaérobie agricole : Mise en place et optimisation d'un pré-traitement thermique pour l'inactivation des spores de Clostridium

Cédric Delmon

► **To cite this version:**

Cédric Delmon. Digestion anaérobie agricole : Mise en place et optimisation d'un pré-traitement thermique pour l'inactivation des spores de Clostridium. Sciences de la Terre. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0089 . tel-04691749

**HAL Id: tel-04691749**

**<https://theses.hal.science/tel-04691749v1>**

Submitted on 9 Sep 2024

**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.

**Université de Limoges**

**ED 614 - Chimie , Environnement, Géosciences, Agrosiences  
(CEGA)**

**Laboratoire E2Lim Eau et Environnement**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**

**Doctorat Eau Sol Environnement**

Présentée et soutenue par  
**Delmon Cédric**

Le

**Digestion anaérobie agricole : Mise en place et optimisation d'un  
pré-traitement thermique pour l'inactivation des spores de  
Clostridium.**

Thèse dirigée par **Magali CASELLAS** et **Audrey PROROT**

JURY :

Président du jury

.

Rapporteurs

Mme. **Véronique Broussolle**, Directrice de Recherche-HDR, Laboratoire INRAE UMR  
408 SQPOV, Université d'Avignon

Mme. **Anne-Marie Pourcher**, Directrice de Recherche-HDR, Laboratoire INRAE UR  
1466 OPAALE, INRAE Bretagne-Normandie

Examineurs

M. **Christophe Dagot**, Professeur des Universités, Laboratoire INSERM UMR 1092  
RESINFIT, Université de Limoges

M. **Xiaojun Liu**, Maître de Conférences, Laboratoire TIMR UTC-ESCOM, Université  
de Technologie de Compiègne





*Tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais*

**Xavier Dolan**

# Remerciements

---

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Introduction .....	14
Chapitre I. Etude bibliographique.....	24
I.1. Digestion anaérobie des déchets agricoles .....	25
I.1.1. Processus biologique général de la digestion anaérobie .....	25
I.1.1.1. Hydrolyse .....	26
I.1.1.2. Acidogenèse .....	26
I.1.1.3. Acétogenèse .....	27
I.1.1.4. Méthanogenèse .....	27
I.1.2. Les différents types de mise en œuvre de la méthanisation .....	29
I.1.3. Réglementation, gisement et caractérisation des intrants pour la méthanisation agricole .....	31
I.1.3.1. Règlementation des intrants de type sous-produits animaux destinés à être méthanisés .....	31
I.1.3.2. Gisement des intrants spécifiques à la digestion anaérobie agricole .....	33
I.1.3.3. Caractérisation des intrants.....	35
I.1.4. Les digestats agricoles : réglementation et valeur agronomique .....	37
I.1.4.1. Retour au sol des digestats et réglementation.....	37
I.1.4.1.1. Digestat en logique « déchet » .....	37
I.1.4.1.1.1. Installation soumise à déclaration .....	37
I.1.4.1.1.2. Installation soumise à enregistrement .....	37
I.1.4.1.1.3. Installation soumise à autorisation .....	38
I.1.4.1.2. Digestat en logique « produit » .....	39
I.1.4.1.2.1. Critères pour que le digestat soit considéré comme un amendement organique en logique produit.....	39
I.1.4.1.2.2. Procédure d'homologation : Critères pour que le digestat soit considéré comme une matière fertilisante.....	40
I.1.4.1.2.3. Valeurs agronomiques des digestats.....	41
I.1.4.1.3. Evolutions réglementaires pour les digestats .....	42
I.2. Paramètres de la digestion anaérobie influençant le potentiel hygiénisant .....	45
I.2.1. Micro-organismes indicateurs du potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie.....	45
I.2.2. Influence des paramètres de conduite des digesteurs sur l'hygiénisation des digestats.....	46
I.2.2.1. Effets de la température de conduite de la méthanisation sur les organismes indicateurs .....	46
I.2.2.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	47
I.2.2.1.2. Entérocoques .....	48
I.2.2.1.3. <i>Clostridium perfringens</i> .....	50
I.2.2.2. Impact du temps de séjour dans le méthaniseur sur l'hygiénisation des digestats .....	51
I.2.2.3. Effets hygiénisants du pH et de la concentration en AGV dans le méthaniseur .....	52
I.3. Pré-traitement des intrants .....	53
I.3.1. Pré-traitements physiques .....	53
I.3.2. Pré-traitements chimiques .....	57
I.3.3. Effets du couplage de pré-traitements physiques et chimiques.....	60

I.4. Hygiénisation des substrats et <i>Clostridium perfringens</i> .....	62
I.4.1. Caractéristiques de <i>Clostridium perfringens</i> .....	62
I.4.2. La sporulation : un processus complexe .....	62
I.4.2.1. Facteurs influençant la sporulation .....	63
I.4.2.2. Etapes de la sporulation .....	65
I.4.2.3. Structure de la spore .....	66
I.4.2.4. Facteurs sensibilisant la résistance de la spore .....	67
I.4.3. Traitements appliqués sur les formes sporulantes bactériennes .....	68
I.4.3.1. Traitements physiques .....	69
I.4.3.2. Traitements chimiques .....	71
I.5. Techniques de caractérisation microbiologique des bactéries sporulantes .....	75
I.5.1. Techniques culturales classiques .....	75
I.5.2. Microscopie électronique .....	76
I.5.3. Analyses directes <i>via</i> des marqueurs de l'activité métabolique et de l'intégrité membranaire .....	77
I.5.3.1. Les marqueurs fluorescents .....	77
I.5.3.2. Visualisation de la fluorescence .....	79
Chapitre II. Matériel et méthodes .....	82
II.1. Caractérisation des effets des pré-traitements à l'échelle du réacteur .....	85
II.1.1. Substrats : origine et préparation de la matrice .....	85
II.1.2. Caractérisation physico-chimique .....	85
II.1.2.1. Matières Sèches (MS) .....	85
II.1.2.2. Matières Volatiles (MV) .....	86
II.1.2.3. pH .....	86
II.1.3. Pré-traitements appliqués au fumier .....	86
II.1.3.1. Traitement du fumier par des acides faibles : les AGV .....	88
II.1.3.2. Traitement thermique du fumier par pasteurisation .....	88
II.1.3.3. Traitement acido-thermique du fumier .....	88
II.1.4. Caractérisation microbiologique .....	89
II.1.4.1. Dénombrement des spores de <i>Clostridium perfringens</i> .....	89
II.1.4.2. Dénombrement des <i>Escherichia coli</i> .....	90
II.1.4.3. Dénombrement des entérocoques .....	91
II.1.5. Evaluation des effets générés par les pré-traitements .....	91
II.1.5.1. Mesure du potentiel hygiénisant sur la matrice .....	91
II.1.5.2. Evaluation du potentiel méthanogène des fumiers traités .....	92
II.1.5.2.1. Inoculum utilisé .....	92
II.1.5.2.2. Dispositif/Protocole expérimental de réalisation des tests BMP sur le fumier traité .....	93
II.1.5.2.3. Mesure de la production de biogaz .....	95
II.1.5.3. Analyses statistiques .....	96
II.2. Caractérisation des effets des pré-traitements à l'échelle bactérienne .....	96
II.2.1. Souche bactérienne utilisée et techniques de culture .....	96
II.2.1.1. Souche bactérienne .....	96
II.2.1.2. Milieux de croissance et de sporulation .....	97
II.2.1.2.1. Culture en milieu solide .....	97
II.2.1.2.2. Culture en milieu liquide .....	97
II.2.1.2.3. Milieu de sporulation .....	97
II.2.1.3. Culture biphasique .....	98

II.2.2. Pré-traitements appliqués.....	100
II.2.2.1. Pré-traitements acides .....	101
II.2.2.2. Pré-traitement thermique.....	101
II.2.2.3. Pré-traitements acido-thermiques .....	101
II.2.3. Caractérisation des effets générés par les pré-traitements sur une culture pure bactérienne .....	101
II.2.3.1. Marquages fluorescents.....	101
II.2.3.2. Caractérisation des effets par cytométrie en flux .....	103
II.2.3.2.1. Définition et principe de la cytométrie en flux .....	103
II.2.3.2.2. Caractéristiques techniques et analyse des échantillons .....	104
II.2.3.3. Caractérisation des effets par imagerie en flux.....	105
II.2.3.3.1. Principe général.....	105
II.2.3.3.2. Caractéristiques techniques et analyse des échantillons .....	106
II.2.3.3.3. Analyse des données par le logiciel IDEAS®.....	107
Chapitre III. Résultats et discussion.....	109
III.1. Application des pré-traitements sur une matrice complexe : impact sur le pouvoir hygiénisant et sur le potentiel méthanogène .....	110
III.1.1. Objectifs et stratégie .....	110
III.1.2. Publication.....	111
III.1.3. Complément d'informations .....	127
III.1.4. Conclusion.....	131
III.2. Application des pré-traitements sur une culture pure de <i>Clostridium perfringens</i> : analyse des effets par cytométrie en flux .....	133
III.2.1. Objectifs et stratégie .....	133
III.2.2. Publication.....	134
III.2.3. Conclusion.....	149
III.3. Application des pré-traitements sur une culture pure de <i>Clostridium perfringens</i> : analyse des effets par imagerie en flux .....	150
III.3.1. Etude d'une culture pure de <i>Clostridium perfringens</i> par imagerie en flux (IMF) .....	151
III.3.1.1. Principe général de l'IMF.....	151
III.3.1.1.1. Traitement des données : Stratégie de « gating ».....	151
III.3.1.1.2. Sélection des paramètres morphologiques d'intérêt.....	154
III.3.1.2. Evolution des différentes sous-populations au cours de la sporulation .....	159
III.3.1.2.1. Evolution de la sporulation au sein de la zone « formes végétatives actives » .....	159
III.3.1.2.2. Evolution de la sporulation au sein de la zone « formes sporulées » ...	162
III.3.2. Caractérisation des effets d'un traitement acido-thermique sur <i>Clostridium perfringens</i> par imagerie en flux .....	164
III.3.2.1. Traitement thermique .....	165
III.3.2.2. Traitements acides.....	166
III.3.2.2.1. Effets sur les formes sporulées.....	166
III.3.2.2.2. Effets sur les formes végétatives actives .....	168
III.3.2.3. Traitements acido-thermiques .....	171
Conclusion générale.....	175
Références bibliographiques .....	179

## Table des illustrations

---

Figure 1. Epannage de produits résiduels organiques ou matières fertilisantes d'origine résiduelle (MAFOR) (1).....	15
Figure 2. La méthanisation à la ferme (6).....	18
Figure 3. Schéma simplifié du processus biologique de la méthanisation (7).....	19
Figure 4. Objectifs de la thèse et méthodologie mise en œuvre. ....	22
Figure 5. La méthanisation agricole (12).....	25
Figure 6. Etapes de la digestion anaérobie (14). ....	26
Figure 7. Arbre phylogénétique montrant les bactéries, les archées et les eucaryotes (15)..	27
Figure 8. Schéma détaillé des principaux processus de dégradation de la matière organique (16).....	28
Figure 9. Mise en œuvre de la méthanisation (26).....	34
Figure 10. Valorisation du digestat en France (46). ....	43
Figure 11. Image de <i>Escherichia coli</i> (issu de <a href="https://www.cdc.gov">https://www.cdc.gov</a> ).....	47
Figure 12. Image d'entérocoques (issu de <a href="https://www.cdc.gov">https://www.cdc.gov</a> ). ....	49
Figure 13. Diagramme de prédominance des espèces en fonction du pH du milieu. ....	59
Figure 14. Mécanisme d'action des acides organiques sur les bactéries (75).....	59
Figure 15. Image de formes végétatives (à gauche, grossissement *1000) et d'une spore de <i>Clostridium perfringens</i> (à droite, grossissement *40 000) (98,99).....	63
Figure 16. Facteurs responsables de la sporulation de <i>Clostridium perfringens</i> (adapté de (106)). ....	64
Figure 17. Cycle de sporulation de <i>Clostridium sp.</i> (112).....	66
Figure 18. spore de <i>Clostridium perfringens</i> (115).....	66
Figure 19. Image d'une spore d' <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> après un traitement de 600 MPa pendant 5 minutes à 80°C (120).....	69
Figure 20. Etats physiologiques bactériens dans l'environnement (141).....	76
Figure 21. Spore de <i>Clostridium perfringens</i> obtenue par microscopie électronique à transmission (115).....	76
Figure 22. Spore de <i>Clostridium difficile</i> obtenue par microscopie électronique à balayage (143).....	77
Figure 23. Sites cellulaires cibles des sondes fluorescentes pouvant mettre en évidence des paramètres structuraux et/ou fonctionnels dans une bactérie (146).....	78
Figure 24. Schéma méthodologique des investigations menées lors des pré-traitements des intrants en conditions réelles sur l'hygiénisation et sur le pouvoir méthanogène.....	84
Figure 25. Schéma méthodologique des investigations menées sur la compréhension mécanistique des pré-traitements d'hygiénisation. ....	84

Figure 26. Photographie du tas de fumier prélevé. ....	85
Figure 27. Préparation et traitements appliqués sur le fumier bovin (en triplicat). ....	87
Figure 28. Méthode de dénombrement des spores de <i>Clostridium perfringens</i> au sein du fumier bovin. ....	90
Figure 29. Méthode de dénombrement des <i>Escherichia coli</i> et des entérocoques au sein du fumier bovin. ....	91
Figure 30. Préparation des tests BMP avec différents fumiers (pré-traités ou non). ....	94
Figure 31. Mesure quotidienne de la production de biogaz par un système de type eudiomètre. ....	95
Figure 32. Schéma du protocole d'une culture biphasique de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	99
Figure 33. Etape de préparation et application des différents traitements sur <i>Clostridium perfringens</i> . ....	100
Figure 34. Principe du double marquage CFDA-IP (173). ....	102
Figure 35. Principe de la cytométrie en flux. ....	103
Figure 36. Représentation d'un cytogramme type obtenu après double marquage CFDA/IP d'un échantillon de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	104
Figure 37. Principe de l'imagerie en flux. ....	105
Figure 38. Représentation schématique du système optique de l'imageur en flux : Image Stream X AMNIS® (adapté de <a href="https://www.merckmillipore.com">https://www.merckmillipore.com</a> ). ....	106
Figure 39. Imageur en Flux ISX (Amnis Corporation®, USA). ....	107
Figure 40. Concentration en entérocoques avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D). ....	128
Figure 41. Concentration en <i>Escherichia coli</i> avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D). ....	129
Figure 42. Concentration en <i>Clostridium perfringens</i> totaux avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D). ....	130
Figure 43. Concentration en spores de <i>Clostridium perfringens</i> avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D). ....	130
Figure 44. Stratégie de sélection des populations d'intérêt. ....	152
Figure 45. Cytogrammes d'un échantillon de <i>Clostridium perfringens</i> issu d'une culture de 48h en milieu Duncan Strong obtenus après analyse par imagerie en flux (Figure 45A) et par cytométrie en flux (Figure 45B). ....	153
Figure 46. Paramètres morphologiques analysés avec le logiciel IDEAS® (175). ....	155
Figure 47. Identification des sous-populations d'intérêt au sein des formes sporulées (doubles négatives) de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	157

Figure 48. Analyse morphologique des cellules au sein de la population « végétatives actives » (vivantes) de <i>Clostridium perfringens</i> .....	158
Figure 49. Evolution de la morphologie des cellules végétatives actives (vivantes) de <i>Clostridium perfringens</i> au cours de la sporulation. ....	160
Figure 50. Evolution de la morphologie des formes sporulées (doubles négatives) de <i>Clostridium perfringens</i> au cours de la sporulation. ....	162
Figure 51. Potentiel cycle de sporulation de <i>Clostridium perfringens</i> dans le milieu Duncan Strong obtenu par imagerie en flux.....	163
Figure 52. Exemples de cytogrammes obtenus après analyse par imagerie en flux d'un échantillon témoin (A), traité thermiquement (B), traité aux AGV (C), traité de façon acido-thermique (D) après 24h de culture dans le milieu Duncan Strong. ....	164
Figure 53. Analyse des effets d'un traitement thermique à 70°C pendant une heure sur <i>Clostridium perfringens</i> par imagerie en flux : histogrammes représentant les proportions des formes arrondies et bâtonnets au sein de la population de spores, au cours du temps, avant et après traitement thermique.....	165
Figure 54. Analyse des effets des traitements acides sur les formes sporulées (doubles négatives) de <i>Clostridium perfringens</i> par imagerie en flux : histogrammes représentant les proportions des formes « arrondies » et « bâtonnets » au sein de la population de formes sporulées selon différentes concentrations en AGV et différents temps d'incubation.....	167
Figure 55. Analyse des effets des traitements acides sur les formes végétatives actives (vivantes) de <i>Clostridium perfringens</i> par imagerie en flux.....	169
Figure 56. Analyse des effets des traitements acido-thermiques sur les formes sporulées (doubles négatives) de <i>Clostridium perfringens</i> par imagerie en flux : histogrammes représentant les proportions des formes « arrondies » et « bâtonnets » au sein de la population de formes sporulées selon différentes concentrations en AGV + traitement thermique et différents temps d'incubation. ....	172
Figure 57. Cytogrammes obtenus après analyse par imagerie en flux d'un échantillon témoin (A), traité thermiquement (B), traité aux AGV (C), traité de façon acido-thermique (D) et effets des différents traitements sur les différentes populations bactériennes de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	174

## Table des tableaux

---

Tableau 1. Différences entre une méthanisation en condition mésophile et une méthanisation en condition thermophile (18). .....	30
Tableau 2. Comparaison des procédés employés pour les voies sèche et humide de la méthanisation (13).....	30
Tableau 3. Classification et traitement des sous-produits animaux avant méthanisation (25). .....	33
Tableau 4. Caractéristiques des déchets issus des activités agricoles (14). .....	35
Tableau 5. Micro-organismes recherchés dans le digestat issu d'une installation soumise à enregistrement (20) .....	38
Tableau 6. Valeurs limites de la concentration en micro-organismes présents dans les amendements organiques (36).....	40
Tableau 7. Concentrations maximales en micro-organismes recommandées par l'ANSES dans des MFSC (38) .....	41
Tableau 8. Teneur en éléments fertilisants au sein de digestats issus du monde agricole (40).....	42
Tableau 9. Concentrations en <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Clostridium perfringens</i> dans du fumier frais et méthanisé (adapté de (41,42)).....	42
Tableau 10. Teneurs maximales en micro-organismes dans le digestat agricole destiné à être utilisé en tant que matière fertilisante en France (43). .....	44
Tableau 11. Effets de la digestion anaérobie sur l'abattement de la concentration en <i>Escherichia coli</i> . .....	48
Tableau 12. Effets de la digestion anaérobie sur l'abattement de la concentration en entérocoques.....	49
Tableau 13. Effets de la digestion anaérobie sur l'abattement de la concentration en <i>Clostridium perfringens</i> .....	50
Tableau 14. Effet des traitements micro-ondes sur la concentration en agents pathogènes. 54	
Tableau 15. Effet des traitements ultrasons sur la concentration en agents pathogènes. ....	55
Tableau 16. Effet des champs électriques pulsés sur la concentration en agents pathogènes. ....	56
Tableau 17. Effet des traitements thermiques sur la concentration en agents pathogènes. ..	57
Tableau 18. Effet des traitements alcalins sur la concentration en agents pathogènes.....	58
Tableau 19. Effet de traitements avec des acides forts sur la concentration en agents pathogènes. ....	58
Tableau 20. Effet des traitements avec des acides organiques sur la concentration en agents pathogènes. ....	60
Tableau 21. Effet des traitements physico-chimiques sur la concentration en agents pathogènes. ....	60

Tableau 22. Facteurs modulateurs de la sporulation. ....	65
Tableau 23. Types et effets des traitements physiques sur les spores de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	70
Tableau 24. Traitement à partir de molécules extraites à partir de composés naturels et effets sur les spores de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	72
Tableau 25. Types et effets des traitements chimiques sur les spores de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	73
Tableau 26. Marqueurs fluorescents utilisés sur des bactéries sporulantes. ....	79
Tableau 27. Pré-traitements appliqués sur le fumier. ....	87
Tableau 28. Formule chimique et pKa des acides gras volatils employés lors des expérimentations. ....	88
Tableau 29. Milieux et conditions nécessaires pour le dénombrement des agents pathogènes dans du fumier après application des pré-traitements. ....	91
Tableau 30. Caractéristiques de <i>Clostridium perfringens</i> (en conditions de laboratoire) (139,171). ....	97
Tableau 31. Types de milieux de culture bactériens employés lors des expérimentations sur <i>Clostridium perfringens</i> . ....	98
Tableau 32. Traitements appliqués sur une culture pure de <i>Clostridium perfringens</i> en milieu Duncan Strong. ....	100
Tableau 33. Canaux d'intérêt de l'imageur en flux dans le cadre de nos expérimentations. ....	107
Tableau 34. Effets des traitements thermique, acides et acido-thermiques sur les formes végétatives et sporulées de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	149
Tableau 35. Les différents paramètres morphologiques analysés avec le logiciel IDEAS® pour la recherche d'un caractère discriminant au sein d'une population. ....	156

# Introduction

✓ **La valorisation des MAFOR en France par épandage agricole : éléments de discussion « problématique de leur contenu chimique et microbiologique ».**

Les MAFOR sont des « matières fertilisantes d'origine résiduaire », elles incluent différents types de sources « boues de station », « déchets verts », déjections animales... A l'exception des déchets d'ordures ménagères. La stratégie adoptée par la France pour la valorisation des Matières Fertilisantes d'Origine Résiduaires est celle de la « valorisation matière » via l'épandage agricole (Figure 1).

## Epandage de produits résiduaires organiques (PRO) ou matières fertilisantes d'origine résiduaire (MAFOR)

### Diversité des matières en France :

- Essentiellement agricole: **94% d'effluents d'élevage**
- Composts et Mafor d'origine industrielle et urbaine: 6% restant (**15 à 80% des ressources recyclées**)

### Quantités totales de fumure organique apportées sur les sols agricoles en 2011

(Source : Agreste – Enquête Pratiques culturales grandes cultures et prairies 2011)

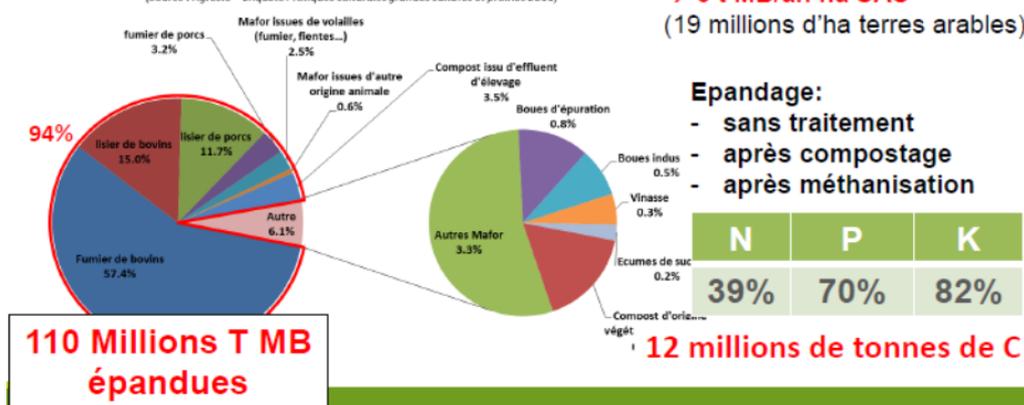


Figure 1. Epandage de produits résiduaires organiques ou matières fertilisantes d'origine résiduaire (MAFOR) (1).

Au regard des quantités épandues, la Figure 1 montre que ce sont les déjections animales qui représentent l'immense majorité des MAFOR épandues (94%), même si l'épandage des boues est plus « médiatisé » et « réglementé ». L'épandage des déjections animales présente aussi l'avantage d'une disponibilité quasi inépuisable de matière fertilisante.

La valorisation des MAFOR par épandage permet non seulement une fertilisation (par l'apport des quantités de N (azote), P (phosphore), K (potassium) nécessaires à la croissance des végétaux) et un amendement (par l'apport de matière organique (carbone (C)) notamment dans les sols. En outre, cela permet de réduire la consommation d'engrais qui sont coûteux pour les exploitants agricoles et issus de réserves naturelles non renouvelables (cercle non vertueux).

Cependant, ce choix nécessite une surveillance très étroite des qualités chimique, microbiologique et physique (siccité par exemple) des MAFOR épandues. L'épandage des boues d'épuration par exemple est strictement réglementé. Leur contenu en contaminants divers est mesuré et un plan d'épandage est déterminé. L'hygiénisation des boues de station d'épuration est très important et de nombreux procédés existent pour atteindre cet objectif (chaulage, méthanisation suivie d'un compostage...). D'autres pays comme la Suisse, ont fait

le choix d'assurer une innocuité totale des MAFOR qui sont toutes traitées par pyrolyse (chauffage à 500°C), ce qui aboutit à un produit que l'on appelle le biochar. Ce dernier contient du carbone à libération lente et peut aussi être épandu.

En France, la majorité des déjections animales (fumiers, lisiers) sont épandues directement sur les sols ou après compostage (2). Les déjections animales ne font pas l'objet d'une réglementation particulière quant à leur contenu avant épandage (pratique ancestrale pour la fertilisation des sols) mais nécessitent un plan d'épandage validé par les chambres d'agriculture (en vue de la préservation des cours d'eau la plupart du temps). Les effluents d'élevage représentent 94% des matières épandues sur les sols (Figure 1). La plupart du temps ils sont épandus sans traitement préalable.

L'épandage direct (sans pré-traitement de type compostage ou méthanisation) des déjections animales présente certains inconvénients. L'épandage direct des lisiers par exemple conduit à une perte d'azote ammoniacal par évaporation (3).

Le « compostage » des fumiers avant épandage est largement pratiqué car il constitue en fait un mode de stockage pour les exploitants, entre deux plans d'épandage ou en fonction des cultures produites. Ce stockage permet une certaine hygiénisation, la destruction des graines d'adventices, l'épandage sur cultures dont le cycle est inadapté à un apport sous forme de fumier frais, la suppression des mauvaises odeurs (appétence de l'herbe), l'homogénéisation du produit, la diminution de la masse à épandre, la facilité d'épandage, et une possibilité d'application toute l'année (2). Cependant les conditions du stockage des fumiers lors du compostage sont généralement peu ou pas contrôlées ce qui génère une grande hétérogénéité en termes de contenu et de texture (y compris au sein d'une même exploitation). Ce manque de contrôle influe sur sa valeur fertilisante et amendante mais aussi sur son hygiénisation.

La valorisation par épandage des matières fertilisantes d'origine résiduaire est donc un choix étayé par de nombreux avantages. Cependant, le développement des connaissances dans les domaines de la chimie analytique et microbiologique a permis de mettre en évidence un certain nombre de questions relatives à la contamination chimique (présence de métaux lourds ou de résidus de médicaments) et microbiologique (présence de bactéries pathogènes ou antibiorésistantes) des MAFOR et aux conséquences possibles sur les sols épandus.

✓ **Le cercle vertueux de la méthanisation des déchets agricoles (déjections animales, déchets de céréales, CIVE...) : un moyen de coupler production d'énergie renouvelable et production d'un fertilisant agricole le digestat ?**

Les énergies fossiles telles que le pétrole se raréfient et sont particulièrement polluantes. De plus, le recyclage de la matière organique pour produire de l'énergie (chaleur notamment) est connu depuis la nuit des temps par la combustion du bois ou du charbon de bois, des déjections animales... Cependant, cette énergie bien que produite à partir de matière organique renouvelable conduit aussi à une pollution environnementale par l'émission de gaz à effet de serre (dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) notamment).

La loi de Transition Énergétique pour la Croissance Verte fixe à 10% la consommation de gaz renouvelable à l'horizon 2030, objectif auquel la méthanisation contribue d'ores et déjà. Dans le domaine environnemental, la littérature scientifique et grise montre que les énergies dites « renouvelables » comme l'énergie solaire, éolienne, hydraulique ou organique (méthanisation) constituent l'avenir de notre humanité.

La méthanisation est un atout pour la transition énergétique car de nombreux déchets (agricoles, domestiques, industriels) sont potentiellement méthanisables et peuvent être valorisés grâce à la digestion anaérobie (Figure 2).

La production de méthane est un processus naturel. La découverte du méthane remonte au XVIII<sup>ème</sup> siècle lorsque Monsieur Volta observa un échappement de gaz à partir de la vase du lac Maggiore. Lavoisier, en 1887, appelle ce gaz le « gaz hydrogène carbone » et le terme « méthane » fut attribué en 1892. Le méthane est un gaz à effet de serre, il ne doit donc pas être rejeté dans l'atmosphère à grande échelle.

La France est le premier pays à construire des méthaniseurs de fumier vers 1930. Puis, dans les années 1970, la digestion anaérobie se développe en Europe. La méthanisation de type agricole, délaissée au XX<sup>ème</sup> siècle, revient en force de façon exponentielle au début du XXI<sup>ème</sup> siècle. La méthanisation est alors encouragée par les pouvoirs publics afin de favoriser une production d'énergie à partir d'une ressource renouvelable. Les avancées techniques résultant d'une forte implication financière des pouvoirs publics mais aussi du secteur privé ont permis l'optimisation du procédé. La digestion anaérobie conduit *in fine* par dégradation de la matière organique à la production d'un biogaz constitué de méthane CH<sub>4</sub> et de dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> et d'un résidu plus ou moins pâteux : le digestat. A l'état brut, le biogaz peut être valorisé sous forme d'électricité, de chaleur, voire les deux (cogénération), ou alors il peut être injecté dans le réseau de gaz ou utilisé comme carburant après épuration (injection) : on parle alors de biométhane ou de bioGNV (Figure 2).

La digestion anaérobie constitue une filière d'avenir en France et en Europe. Près de 20 000 méthaniseurs sont répertoriés en Europe (4) et plus de 1 000 installations de méthanisation fonctionnent en France (5). Parmi elles, on compte plus de 800 méthaniseurs de type « agricole ».

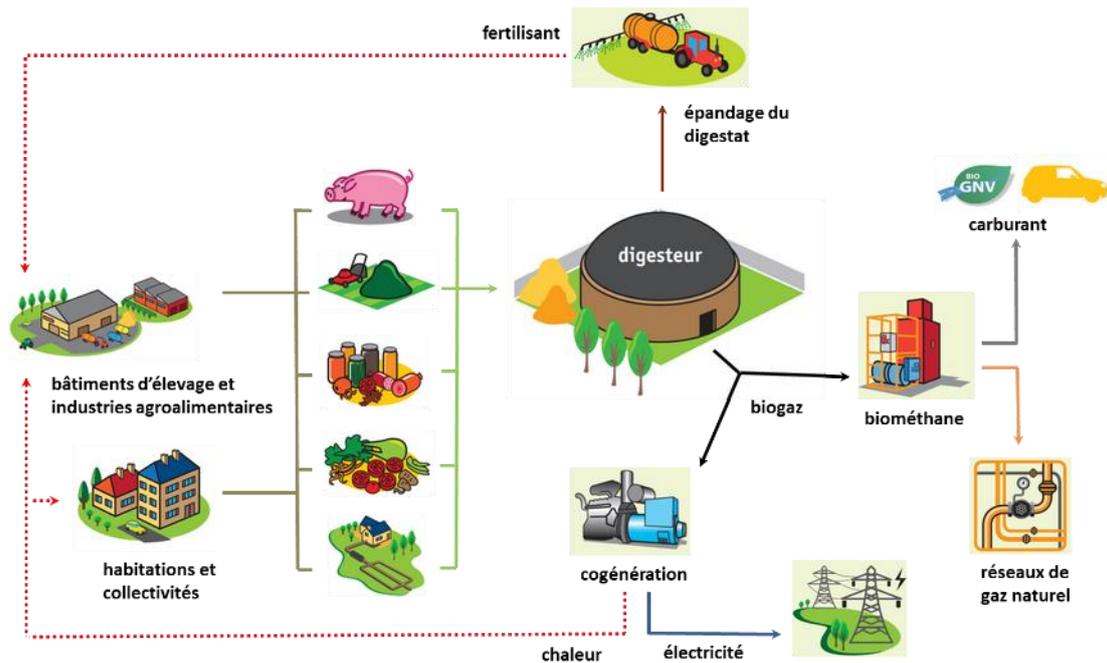


Figure 2. La méthanisation à la ferme (6).

Aujourd’hui, les avancées techniques ont permis de maîtriser ce procédé pour qu’il génère un cercle « vertueux » (Figure 2) : la digestion de différents intrants (= déchets agricoles, d’industries agroalimentaires, déjections animales...) conduit à la production d’un digestat et de biogaz.

Le procédé de méthanisation ou digestion anaérobie peut être décrit comme un processus de dégradation de la matière organique, réalisé par différents types de bactéries anaérobies (Figure 3).

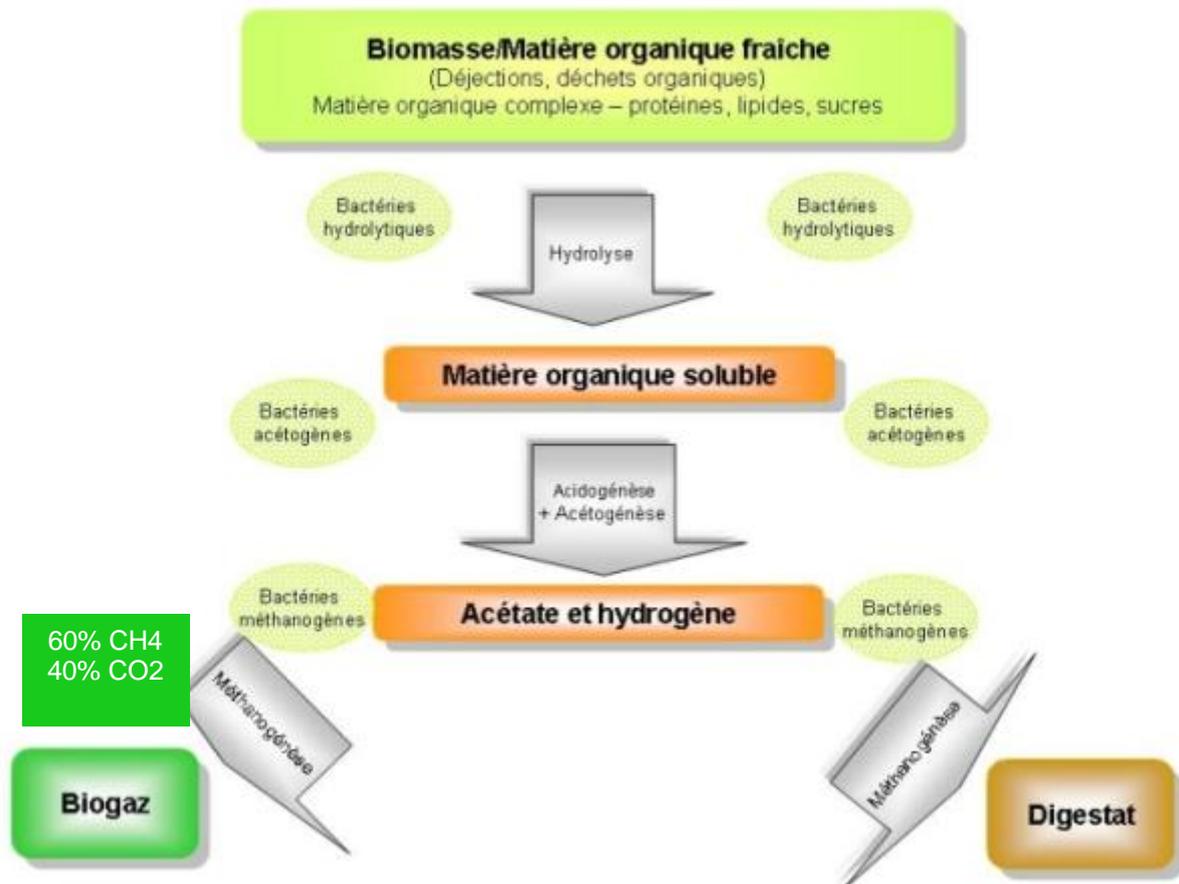


Figure 3. Schéma simplifié du processus biologique de la méthanisation (7).

La méthanisation agricole est un procédé assez robuste en termes de rendement de production de biogaz à condition de respecter drastiquement les consignes de conduites (temps de séjour, température et surtout type d'intrants et leurs ratios respectifs...). De nombreux micro-organismes sont impliqués dans ce processus : les bactéries hydrolytiques, fermentaires, syntrophes ou non syntrophes et les archées dont fait partie *Clostridium*.

✓ **La controverse de l'épandage des digestats de méthaniseurs agricoles : problématique de la persistance de bactéries pathogènes de la famille des *Clostridium* dans les digestats épandus.**

Le digestat est une matière digérée peu odorante, en comparaison à du fumier ou du lisier par exemple, dont les caractéristiques sont dépendantes des types de matières qui ont réagi dans le méthaniseur. Les digestats peuvent être riches en éléments nutritifs (azote, phosphore et potassium, essentiels pour la croissance des plantes). Des précautions doivent être prises quant à leur utilisation mais ils peuvent ainsi se substituer aux engrais de synthèse sous certaines conditions. Ces conditions sont notamment décrites dans le rapport ADEME de janvier 2015 sur « Le cadre réglementaire et juridique des activités agricoles de méthanisation et de compostage » (8).

En France, la méthanisation peut être utilisée pour traiter plusieurs types de déchets, on distingue ainsi trois types de filières :

- ✓ → La digestion anaérobie des installations de stockage de déchets non dangereux (ISDND).
- ✓ → La méthanisation des boues de stations d'épuration des eaux usées (STEP).
- ✓ → **La méthanisation de matières végétales brutes, des déchets ou sous-produits d'industries agro-alimentaires, d'exploitations agricoles.**

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés au dernier type de méthanisation. Ce recyclage de la matière est en plein essor au sein du secteur agricole grâce au développement de la méthanisation directement « à la ferme » encouragé par le ministère de l'agriculture notamment. Le décret qui définit les conditions pour que la méthanisation soit considérée comme activité agricole est paru le 19 février 2011 (9). Ce décret « d'application immédiate » était déjà prévu dans le cadre la loi de modernisation agricole (LMA) de juillet 2010 (10). Le texte permet dorénavant aux exploitants méthaniseurs de commercialiser de l'énergie (biogaz, chaleur et électricité) dans le cadre de leur exploitation agricole ou *via* une structure sociétaire où ils détiennent la majorité du capital. Les déchets agricoles doivent néanmoins provenir de l'exploitation à hauteur de 50 % au minimum.

Le digestat généré lors du processus de méthanisation peut être sous différentes formes : solide-liquide (cas de la méthanisation en voie liquide avec séparateur de phase) ou un résidu solide (cas de la méthanisation en voie sèche). Le digestat représente une valeur fertilisante (composition en NPK) qui permet de l'utiliser sous forme d'engrais (ou de fertilisant) destiné à être épandu sur des terres agricoles. Ce procédé présente aussi un intérêt d'un point de vue microbiologique. En effet, il entraîne un effet hygiénisant sur la matière organique introduite dans le méthaniseur (11). Ainsi, le digestat présente, à la sortie du méthaniseur, une teneur en micro-organismes amoindrie par comparaison à la teneur des intrants. Malheureusement, ce pouvoir hygiénisant de la digestion anaérobie ne s'applique pas à tous les micro-organismes et notamment les agents pathogènes. Ainsi, le digestat peut quelquefois renfermer un certain nombre d'agents pathogènes issus des intrants ou étant impliqués dans le processus biologique de la digestion anaérobie. La présence de ces agents pathogènes

dans les digestats pose un problème majeur, celui de la pérennisation de l'épandage des digestats, mettant en péril toute la filière.

Des trillions de bactéries peuplent la surface du globe. Elles font partie intégrante de l'équilibre de notre écosystème. Elles peuvent être bénéfiques pour la santé et peupler le microbiote intestinal humain. Cependant, certaines d'entre elles sont pathogènes pour l'Homme et requièrent une attention toute particulière afin d'éviter la survenue de maladies graves chez l'Homme ou l'animal. Certaines de ces bactéries ont la capacité de survivre dans un environnement aux conditions hostiles à leur développement. L'un des mécanismes mis en œuvre par certaines bactéries pour se « protéger » de conditions hostiles est la sporulation. La spore constitue la forme de protection de la bactérie lui permettant de survivre en étant privée de nutriments et/ou dans un environnement présentant des conditions extrêmes (hautes températures par exemple). Parmi les bactéries capables de sporuler, la famille des *Clostridium* a été particulièrement étudiée. Le caractère ubiquiste de cette bactérie pathogène, et donc sa capacité à persister dans tout type de milieu, engendre des problèmes de santé publique (intoxications alimentaires, botulisme ou gangrène gazeuse). La disparition/réduction de la virulence de cet agent pathogène est cependant possible si l'on arrive à empêcher sa sporulation dans un milieu donné. Depuis de nombreuses années, des études ont porté sur cet objectif. Cependant, à ce jour, aucune technique ne permet d'empêcher la sporulation dans tous les milieux et notamment dans le domaine environnemental.

La question de l'élimination des agents pathogènes en amont ou en aval de la méthanisation est un sujet faisant l'objet de nombreuses études. Les résultats de ces nombreuses études n'aboutissent pas à un véritable succès, c'est-à-dire l'élimination totale des agents pathogènes dans le digestat. Le potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie se révèle notamment insuffisant pour diminuer la concentration d'un agent pathogène particulièrement problématique *Clostridium sp.*. En effet, les formes sporulées de *Clostridium sp.* sont insensibles à l'hygiénisation ayant pour origine la digestion anaérobie. Une solution technique consiste à éliminer à la source, c'est-à-dire au niveau des intrants, les micro-organismes pathogènes, d'autant que c'est à ce niveau que leur présence est la plus élevée.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE :

Il apparaît donc pertinent d'étudier des solutions en amont de la digestion anaérobie pour tenter de diminuer la concentration en agents pathogènes dans le digestat destiné à être épandu sur les terres agricoles. L'objectif de ces travaux de thèse a été de rechercher un pré-traitement (thermique, chimique, et en couplage) permettant d'inactiver les spores de *Clostridium perfringens*. L'effet de ces pré-traitements ont été étudiés d'un point de vue microbiologique (rendements d'élimination des micro-organismes pathogènes sur l'intrant (fumier bovin dans cette étude)) mais aussi sur le procédé de méthanisation (rendement de production de biogaz). Sur le plan microbiologique, l'effet de ces traitements sur la sporulation de *Clostridium perfringens* a été mesuré. En parallèle, des analyses microbiologiques quantitatives ont été réalisées pour étudier une éventuelle diminution de la concentration des différentes formes bactériennes de *Clostridium*, c'est-à-dire les formes végétatives et sporulées. Le traitement doit impacter le plus faiblement possible le procédé afin de conserver le potentiel méthanogène des intrants agricoles et donc la rentabilité économique de l'installation. Pour ce faire, des tests rapides de mesure du potentiel méthanogène (BMP) ont été réalisés en laboratoire sur les différents échantillons pré-traités. La recherche de procédés pouvant potentialiser l'effet hygiénisant de la méthanisation tout en conservant ses performances est donc cruciale. Le procédé d'hygiénisation peut être mis en œuvre en amont (sur les intrants) ou en aval de la digestion (sur le digestat). Différents types de traitements ont été étudiés dans la littérature : procédés physiques, chimiques, physico-chimiques... Lorsque ces traitements sont appliqués en amont de la méthanisation on parle de « pré-traitements ». Ces derniers doivent, dans l'idéal, permettre d'obtenir un digestat dépourvu de micro-organismes pathogènes tout en préservant le rendement de production de biogaz de l'unité de méthanisation.

Les objectifs de la thèse et la méthodologie mise en œuvre sont représentés sur la Figure 4.

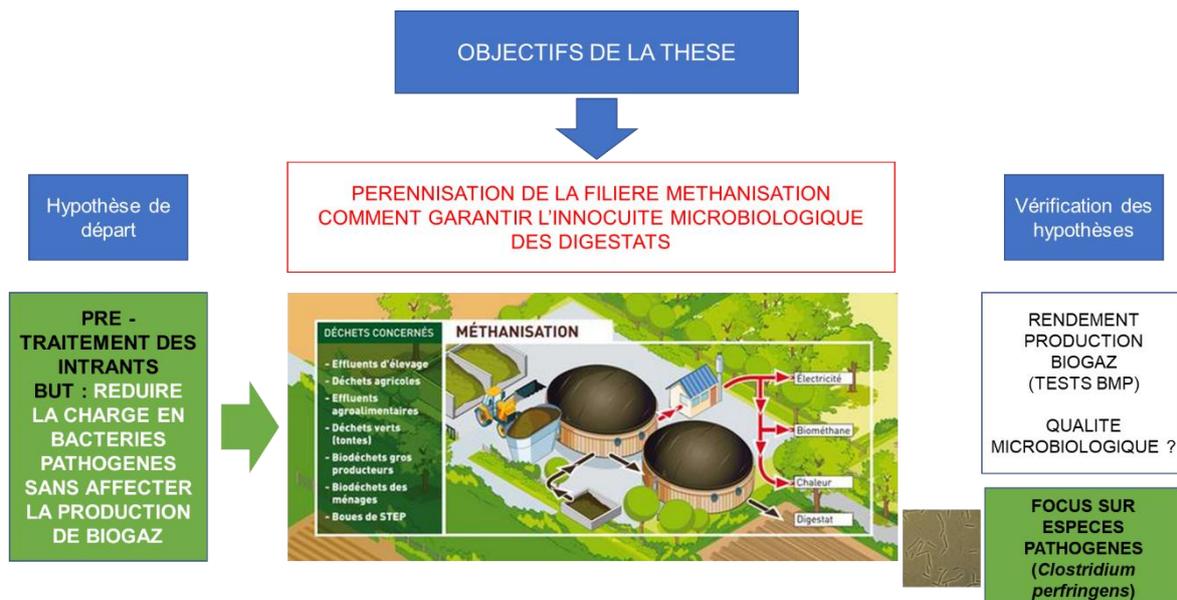


Figure 4. Objectifs de la thèse et méthodologie mise en œuvre.

❖ Le **premier Chapitre** de cette thèse est une **étude bibliographique** permettant de mieux cerner la problématique du devenir de certains micro-organismes au cours du processus de méthanisation : des intrants jusqu'au digestat et de présenter les stratégies mises en œuvre à ce jour pour obtenir une hygiénisation des digestats. Pour ce faire, les points ci-dessous seront abordés.

A) La méthanisation ou digestion anaérobie des déchets agricoles.

B) Les paramètres de la digestion anaérobie influençant le potentiel hygiénisant.

C) Les pré-traitements des intrants.

D) Le cas de *Clostridium perfringens* ainsi que les traitements appliqués sur les bactéries sporulantes.

E) Les techniques de caractérisation microbiologique des bactéries sporulantes.

Le pouvoir hygiénisant du procédé de méthanisation est décrit *via* ses effets sur des agents pathogènes appelés « micro-organismes indicateurs ». Cette étude bibliographique s'attarde un peu plus longuement sur un micro-organisme d'intérêt : *Clostridium perfringens*. Ses capacités d'adaptation grâce au processus de sporulation sont décrites et les traitements ou les facteurs influençant la survie de cette bactérie sont énoncés.

❖ Le **second Chapitre** présente les **Matériels et Méthodes** employés au cours de ces travaux de thèse. La méthodologie utilisée pour répondre aux objectifs présente un aspect fortement pluridisciplinaire de cette thèse allant de la microbiologie au génie des procédés.

❖ Les **Chapitres III.1, III.2, III.3** présentent les résultats obtenus dans ce travail.

→ Le **Chapitre III.1** est rédigé sous la forme d'une publication. Le substrat de travail ou intrant choisi est le fumier. Cet intrant a été particulièrement ciblé car susceptible de contenir de fortes concentrations en micro-organismes pathogènes de type *Clostridium* (les autres intrants de la méthanisation agricole étant en général constitués de déchets de culture céréalière ou fruitière). Conformément à la méthodologie et de manière logique (exclusion directe des pré-traitements abaissant le potentiel méthanogène), l'impact des pré-traitements d'hygiénisation sur le potentiel méthanogène du fumier est présenté.

→ Le **Chapitre III.2** est aussi présenté sous la forme d'une publication. Les effets des pré-traitements à l'échelle de la cellule sur des cultures pures de *C. perfringens* sont présentés. L'outil utilisé pour l'évaluation des effets est la cytométrie en flux.

→ Le **Chapitre III.3** est rédigé de façon conventionnelle. Il présente les effets des pré-traitements sur les mêmes cultures pures de *C. perfringens*. De manière originale, l'outil d'évaluation utilisé est une technique novatrice dans le domaine : *l'Imagerie en flux*.

# **Chapitre I. Etude bibliographique**

## I.1. Digestion anaérobie des déchets agricoles

### I.1.1. Processus biologique général de la digestion anaérobie

Le procédé de digestion anaérobie, permet donc de recycler des déchets dans un cercle « vertueux » (Figure 5) de récupération d'énergie et de matière fertilisante. La méthanisation à la ferme connaît un développement exponentiel, largement encouragé par les autorités (ministère de l'agriculture) afin de favoriser la production « d'énergie verte ».

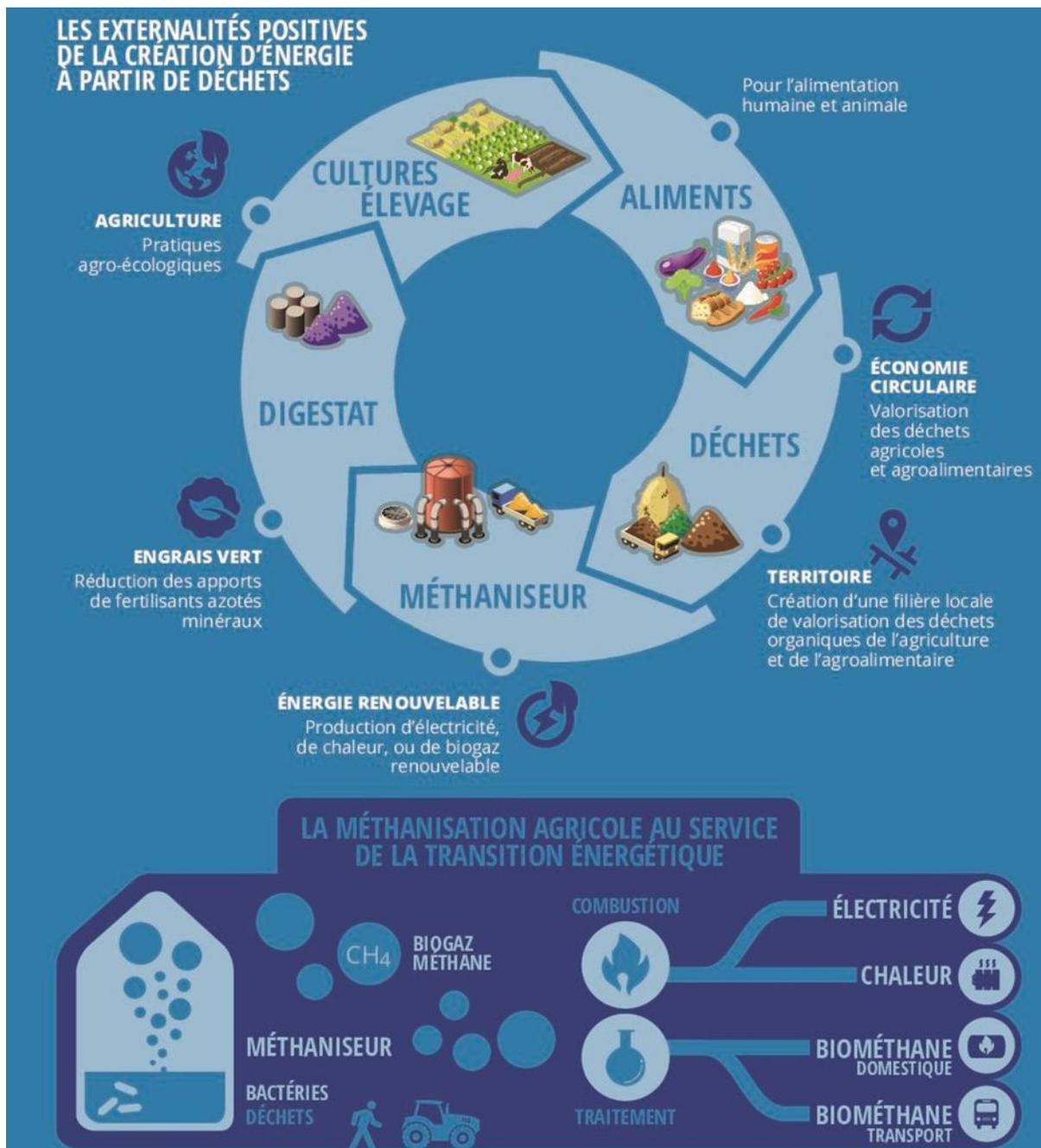


Figure 5. La méthanisation agricole (12).

Le procédé de méthanisation est un processus biologique qui se décompose en 4 étapes (13) (Figure 6). Ces étapes font intervenir différents types de micro-organismes (dont *Clostridium sp.*) participant à la dégradation de la matière organique afin de produire du biogaz et un résidu solide-liquide, le digestat.

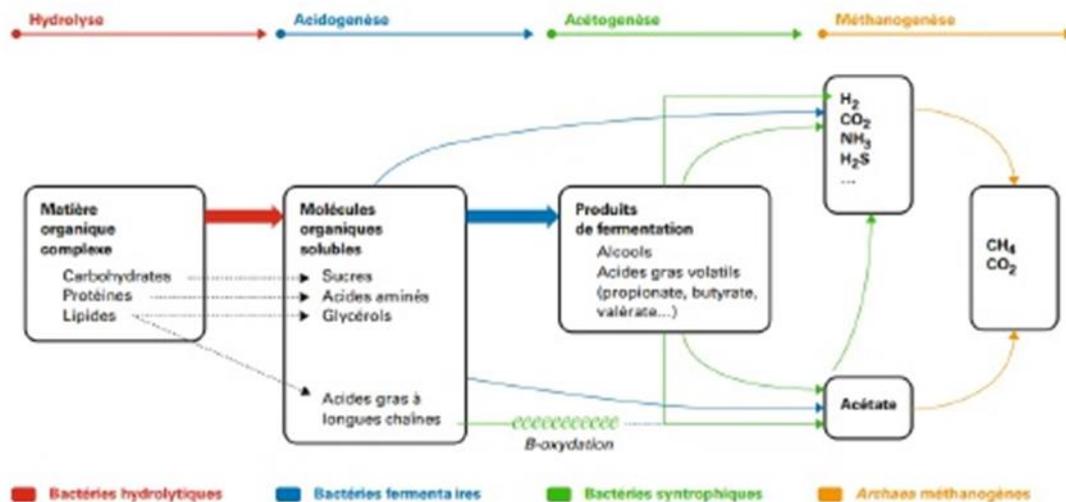


Figure 6. Etapes de la digestion anaérobie (14).

### I.1.1.1. Hydrolyse

L'hydrolyse est la première étape biochimique de la digestion anaérobie. Elle permet de dégrader la matière organique introduite dans le digesteur (Figure 6). Les polymères à longue chaîne (polysaccharides, lipides, protéines) constituant les déchets sont hydrolysés en monomères simples (sucres, alcools, acides gras, acides aminés) grâce à l'action d'enzymes telles que les cellulases, lipases et protéases (13). Ces dernières permettant cette hydrolyse sont produites par des bactéries anaérobies strictes ou facultatives hydrolytiques (Figure 8) telles que *Bacillus*, *Ruminococcus* ou *Clostridium* (étudié lors de ces travaux de thèse). Les molécules produites sont donc plus petites, solubilisées et peuvent subir l'étape d'acidogénèse.

### I.1.1.2. Acidogénèse

Les monomères issus de l'étape d'hydrolyse sont ensuite métabolisés par des micro-organismes fermentaires en acides gras volatils, alcools, acides organiques, hydrogène et dioxyde de carbone (Figure 6). L'acidogénèse est, en général, une étape rapide de la digestion anaérobie. Elle peut, par conséquent, entraîner une accumulation importante d'hydrogène et d'acides gras volatils en cas de surcharge organique ou d'introduction de déchets rapidement fermentescibles dans le digesteur. Cette accumulation d'hydrogène peut entraîner une inhibition de l'acétogénèse. De plus, une accumulation d'acides gras volatils entraîne une baisse de pH et une inhibition du processus de méthanisation par l'inhibition des micro-organismes participant aux étapes biochimiques suivantes de la digestion anaérobie. Les bactéries participant à cette phase d'acidogénèse (Figure 8) peuvent être anaérobies strictes ou facultatives. Les bactéries du genre *Propionibacterium* ainsi que les entérocoques font en outre partie de la communauté bactérienne acidogène.

### I.1.1.3. Acétogénèse

L'acétogénèse se révèle être une étape lente de la digestion anaérobie. Elle permet la formation de dioxyde de carbone, d'acide acétique et de dihydrogène (Figure 6). Ces constituants sont les précurseurs du méthane, composé majoritaire du biogaz. Toutefois, le dihydrogène produit peut être toxique s'il est présent en trop grande quantité et arrêter le processus de méthanisation. Les bactéries participant à cette étape d'acétogénèse (Figure 8) sont les bactéries productrices obligées d'hydrogène (bactéries syntrophes) et les bactéries acétogènes non syntrophes. Les bactéries syntrophes (*Syntrophobacter* ou *Syntrophomonas*) sont des micro-organismes incapables de dégrader les composés seuls. Ils ont besoin de l'aide d'autres micro-organismes non syntrophes participant à cette digestion anaérobie. Parmi les bactéries non syntrophes, on distingue le groupe des homoacétogènes du groupe des sulfato-réductrices. Par exemple, *Clostridium* (étudié lors de cette thèse) fait partie du groupe des homoacétogènes tandis que *Desulfovibrio* ou *Desulfobacter* appartiennent au groupe des sulfato-réductrices.

### I.1.1.4. Méthanogénèse

La dernière étape biochimique de la digestion anaérobie est la méthanogénèse. Les bactéries impliquées dans cette étape font partie de la famille des archées (Figure 7).

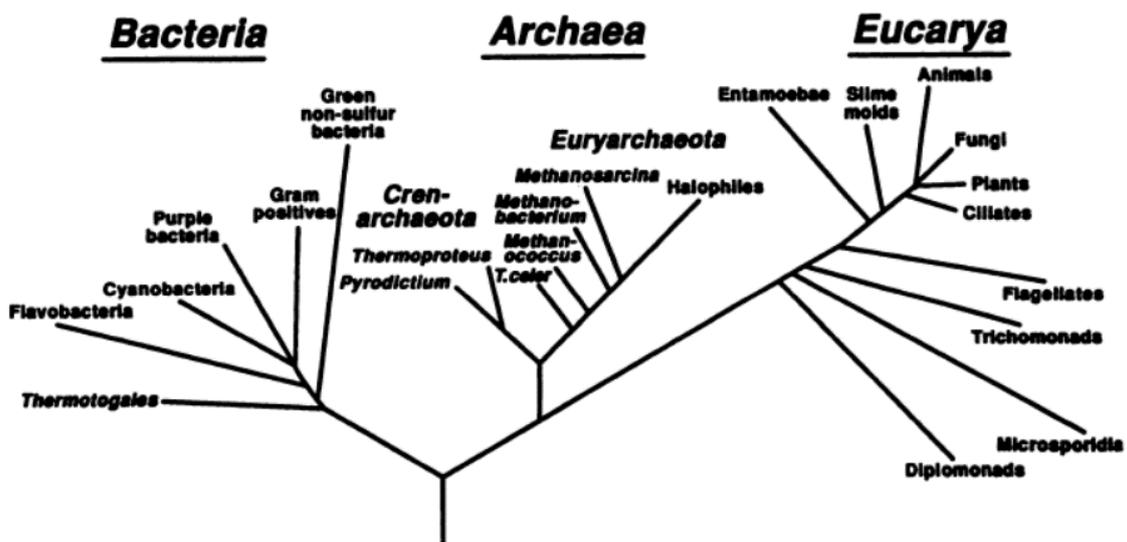


Figure 7. Arbre phylogénétique montrant les bactéries, les archées et les eucaryotes (15).

Les archées méthanogènes sont constituées d'un groupe hydrogénotrophe et d'un groupe acétotrophe, ce qui permet la production de méthane à partir de deux voies métaboliques. La voie hydrogénotrophe utilise l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour former du méthane et de l'eau. Les archées participant à cette voie sont principalement des bactéries du genre *Methanobacterium* ou *Methanogenium*. Enfin, la voie acétotrophe, permise par les bactéries du genre *Methanosaeta* et *Methanosarcina*, produit du méthane et du dioxyde de carbone à partir d'acide acétique.

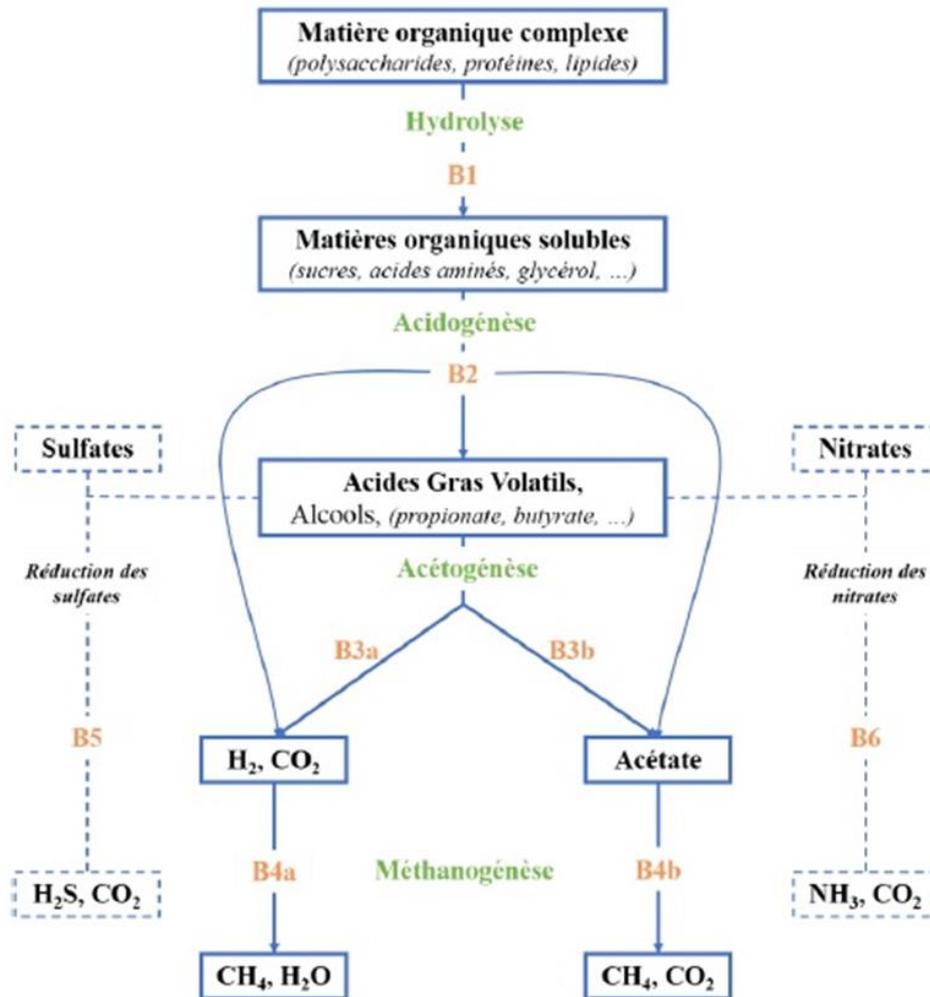


Figure 8. Schéma détaillé des principaux processus de dégradation de la matière organique (16).

B1 = Bactéries hydrolytiques ; B2 = Bactéries acidogènes ; B3a = Bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène (APOH) ; B3b = Bactéries homoacétogènes ; B4a = Bactéries méthanogènes hydrogénotrophes ; B4b = Bactéries méthanogènes acétotrophes ; B5 = Bactéries sulfato-réductrices ; B6 = Bactéries dénitrifiantes.

La méthanisation dure en moyenne 30 jours à 37°C. Ce temps de séjour doit être respecté afin de garantir les conditions optimales pour produire du biogaz à partir de la dégradation des matières organiques par les bactéries (17).

Lorsque ce temps est trop court, on parle de lessivage bactérien et la production de biogaz diminue. Lorsqu'il est trop long, il peut également entraîner une inhibition de la production de biogaz par accumulation d'éléments chimiques (ammonium par exemple) inhibiteurs du développement des micro-organismes (17).

## Les produits de la méthanisation :

**Le biogaz** est constitué en majorité de dioxyde de carbone (25 à 50%) et de méthane (45 à 85%) (EBA). Il peut être valorisé de plusieurs façons (18) :

- en servant de carburant pour les véhicules roulant au GNV (Gaz Naturel pour Véhicules)
- en injection directe dans le réseau de gaz
- en cogénération permettant la production de chaleur et d'électricité.

**Le digestat**, résidu solide-liquide (siccité variable) de la méthanisation, est composé de matière organique non dégradée en condition anaérobie comme les composés azotés, ou des résidus de matière végétale comme la lignine, de matières minérales (potassium (K), phosphore (P) notamment) et d'eau. Il peut donc sous certaines conditions (19,20) retourner au sol pour la fertilisation des terres agricoles (cercle vertueux). Le digestat possède une valeur fertilisante et une valeur amendante (21). La valeur amendante se définit comme la capacité du digestat à augmenter la teneur en matière organique des sols afin d'améliorer son bio fonctionnement. La valeur fertilisante du digestat est basée sur la concentration en éléments nutritifs de ce dernier. Trois éléments sont principalement intéressants pour les cultures agricoles : l'azote, le phosphore et le potassium ou NPK. De manière schématique, on considère que la fraction stable de la matière organique correspond à la valeur amendante tandis que la fraction facilement biodégradable ou biodisponible correspond à la valeur fertilisante du digestat. Le digestat épandu sur les terres agricoles doit présenter une certaine qualité agronomique mais également démontrer une innocuité au niveau microbiologique (19,20).

### **I.1.2. Les différents types de mise en œuvre de la méthanisation**

- **La température** : le processus de digestion anaérobie peut se dérouler à différentes températures et jouer un rôle important sur l'hygiénisation des digestats (cf chapitre I.2.2). La température du digesteur influence également les étapes biochimiques de la méthanisation. Le Tableau 1 ci-dessous présente les principales différences entre une méthanisation en régime mésophile (20 à 45°C) et une méthanisation en régime thermophile (supérieur à 45°C).

Tableau 1. Différences entre une méthanisation en condition mésophile et une méthanisation en condition thermophile (18).

	Régime de méthanisation	
	Mésophile (20 à 45°C)	Thermophile (> 45°C)
<b>Caractéristiques</b>	La plus couramment utilisée Biologie plus stable 20% de la chaleur autoconsommée	Temps de séjour plus court Biologie plus difficile à maîtriser 35% de la chaleur autoconsommée Meilleure dégradation des chaînes carbonées Risque d'inhibition à l'ammonium plus important

- La teneur en matière sèche** dans le digesteur. Il existe deux procédés de méthanisation différents afin de produire du biogaz et du digestat à partir de déchets agricoles : la méthanisation par voie sèche ou la méthanisation par voie humide. Le type de méthanisation est sélectionné en fonction du pourcentage de matière sèche des déchets à méthaniser. Lorsque la teneur en matière sèche est inférieure à 20%, on parle de digestion anaérobie par voie humide. A l'inverse, lorsque cette teneur est comprise entre 20 et 40%, on parle de méthanisation par voie sèche. Le tableau 2 ci-dessous résume les types de pré-traitements, d'agitations et post-traitements employés en fonction de la voie de digestion anaérobie utilisée.

Tableau 2. Comparaison des procédés employés pour les voies sèche et humide de la méthanisation (13).

	Type de méthanisation	
	Voie sèche	Voie humide
<b>Mode de conduite</b>	Discontinu	Infiniment mélangé
<b>Pré-traitement</b>	Criblage à 40 mm	Mécanique et/ou thermique
<b>Type d'agitation</b>	3 possibilités : agitation mécanique/recirculation du biogaz/recirculation du digestat	Agitation mécanique
<b>Post-traitement</b>	Absent	Déshydratation du digestat et réinjection de l'eau dans le réacteur

Par ailleurs, l'apport en intrants lors de la méthanisation par voie sèche est séquencé. On parle donc de voie discontinue. A l'inverse, la voie humide est dite infiniment mélangée car l'apport en intrants est continu et la production de biogaz linéaire (13).

Si le procédé de digestion anaérobie est réalisé en voie humide (< 20 % de matière sèche), le digestat (inodore et partiellement hygiénisé) peut subir un traitement de séparation de phase liquide/solide conduisant à une fraction solide riche en matière organique et en élément phosphaté qui se gère comme un amendement et une fraction liquide contenant de l'azote ammoniacal et peu de matière organique, utilisable comme engrais liquide en remplacement des engrais minéraux azotés.

### **I.1.3. Réglementation, gisement et caractérisation des intrants pour la méthanisation agricole**

Différents types de déchets peuvent être méthanisés et sont appelés intrants : les déchets issus d'industries agro-alimentaires, les déchets des collectivités, les boues issues du traitement des eaux usées et les déchets agricoles (22) (Figure 9). Ils peuvent être solides ou liquides. Le procédé de méthanisation est alors adapté à la siccité du mélange.

- Les déchets issus d'industries agro-alimentaires sont principalement les effluents issus de l'industrie de transformation : les graisses agro-industrielles, les eaux usées d'abattoir, le lactosérum, les eaux de lavage des machines de production en agro-alimentaire... sont les principaux intrants déchets destinés à la digestion anaérobie.
- Les déchets méthanisables des collectivités sont divers et variés. Il est possible de méthaniser des déchets d'entretien d'espaces verts mais aussi des déchets de cuisine collective.
- Les boues et graisses de stations d'épuration sont des matières pouvant entrer dans un processus de méthanisation.
- Les déchets agricoles de type déjection animale ou déchets de cultures.

#### **I.1.3.1. Règulation des intrants de type sous-produits animaux destinés à être méthanisés**

La digestion anaérobie conduit à la production de biogaz, ce qui peut potentiellement représenter un risque. C'est pourquoi, en France, les unités de méthanisation agricoles sont soumises à la réglementation des ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) (23). En fonction de leurs caractéristiques, les projets d'unité de méthanisation sont soumis à déclaration, enregistrement ou à autorisation au titre de la réglementation des ICPE. Ils peuvent être soumis à une évaluation environnementale établie par l'autorité environnementale indépendante au projet de méthaniseur.

Toutes les matières organiques ne peuvent pas être destinées à la digestion anaérobie. Elles peuvent renfermer un grand nombre d'agents pathogènes responsables de graves maladies pour l'Homme et l'animal. C'est pourquoi des procédures d'hygiénisation sont exigées sur certains intrants avant méthanisation. Les intrants les plus souvent employés pour

la digestion anaérobie agricole sont les sous-produits animaux ou SPAN. Un SPAN est défini comme un cadavre entier ou partie d'animaux, produit d'origine animale ou d'autres produits obtenus à partir d'animaux n'étant pas destinés à la consommation humaine y compris les ovocytes, les embryons et le sperme. Il existe trois catégories de SPAN (C1, C2, C3) (Tableau 3) et seules les catégories 2 et 3 peuvent être méthanisées (24).

- ✓ La catégorie 1 est constituée de cadavres d'animaux entiers ou parties de cadavres malades. Les cadavres d'animaux de zoo, de cirque, familiers, ayant subi des expérimentations en laboratoire sont une partie de la catégorie 1. Les déchets de cuisine et de table provenant de moyens de transport internationaux sont aussi dans cette catégorie 1. Tout sous-produit de catégorie 2 ou 3 mélangé avec un sous-produit de catégorie 1 est considéré comme un sous-produit C1.
- ✓ La catégorie 2 renferme le lisier et le contenu du tube digestif des animaux ainsi que l'ensemble des sous-produits non classés dans les catégories 1 et 3.
- ✓ La catégorie 3 est constituée des carcasses ou parties d'animaux propres à la consommation ayant été abattus dans un abattoir ou lors de la chasse mais non consommés ou commercialisés (sang non contaminé, plumes, têtes de volaille, cuirs, peaux etc) ainsi que les déchets de table (exceptés ceux de la catégorie 1).
- ✓ Les catégories 2 et 3 pouvant être méthanisées doivent subir un pré-traitement avant d'être introduites dans le digesteur. Les SPAN de la catégorie 2 doivent être stérilisés sous pression : ces sous-produits sont chauffés à 133°C durant 20 minutes à une pression supérieure ou égale à 3 bars. Par ailleurs, leur taille doit être inférieure ou égale à 5 cm. Les SPAN de la catégorie 3 doivent être « pasteurisés » : ces sous-produits sont chauffés à 70°C durant 1 heure. Par ailleurs, leur taille doit être inférieure ou égale à 1,2 cm. Cependant, certaines dérogations peuvent être accordées à des exploitants employant certaines matières de catégorie 2 et 3 (24).

Tableau 3. Classification et traitement des sous-produits animaux avant méthanisation (25).

<b>Catégorie de SPAN</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>Contenu</b>	<p>Cadavres d'animaux entiers ou partiels de zoo, de cirques, familiers ou de laboratoire</p> <p>Déchets de cuisine et de table de transports internationaux</p> <p>Tous les sous-produits C2 ou C3 mélangés avec des C1</p>	<p>Lisier</p> <p>Contenu du tube digestif des animaux</p> <p>Tous les sous-produits non classés en C1 et C3</p>	<p>Carcasses ou parties d'animaux propres à la consommation</p> <p>Autres déchets de cuisine et de table</p> <p>Matières d'industrie agro-alimentaire</p>
<b>Traitement avant méthanisation</b>	Interdit en digestion anaérobie	Stérilisation sous pression	Pasteurisation

### I.1.3.2. Gisement des intrants spécifiques à la digestion anaérobie agricole

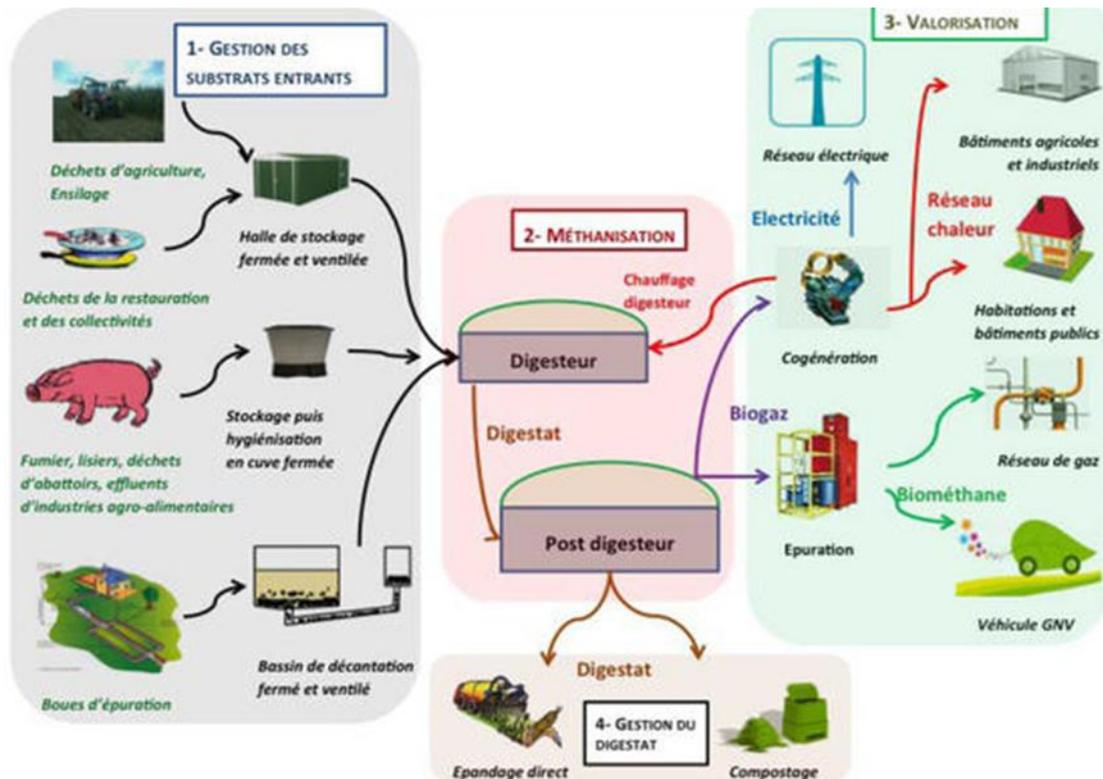


Figure 9. Mise en œuvre de la méthanisation (26).

En 2030, le gisement mobilisable pour la méthanisation s'élèverait à 130 millions de tonnes de matière brute correspondant à 56 TWh en production de biogaz. Ces matières brutes seraient issues à 90% du monde agricole (27). En outre, un projet de méthaniseur est considéré comme une méthanisation agricole lorsque les intrants proviennent à plus de 50% d'installations agricoles (10). Lors de la digestion anaérobie agricole, les principaux déchets agricoles pouvant être méthanisés sont les effluents d'élevage ainsi que les matières végétales (22) :

- Parmi les effluents d'élevage, il est possible de méthaniser des déjections d'animaux à la ferme tels que les bovins et porcins. Le lisier est constitué uniquement de déjections animales tandis que le fumier est un mélange de paille et de déjections animales. Les fientes de volailles peuvent également être méthanisées.
- Les principales matières végétales sont les résidus de culture. Parmi ces résidus, les pailles et céréales d'exploitations agricoles sont couramment utilisées. D'autres résidus de culture peuvent être digérés. Les pulpes de pommes de terre, de betterave, le marc de raisin sont des exemples de résidus méthanisables.

**Très important** : les cultures principales dédiées à la méthanisation sont limitées en France à 15% du total des apports du tonnage brut total des intrants par année civile (28). Ainsi, pour respecter cette règle et donc limiter le recours aux cultures énergétiques dédiées, l'introduction de cultures intermédiaires à vocation énergétique ou CIVE (vesce, avoine, phacélie, pois fourrager, seigle, trèfle, moutarde...) est très intéressante et présente aussi des intérêts environnementaux (limitation du lessivage des nitrates, structuration du sol, lutte contre les adventices, prophylaxie et préservation des espèces pollinisatrices...).

→ **Il existe un consensus dans la littérature : la valorisation des déchets agricoles par méthanisation est à privilégier car ils sont facilement méthanisables.** L'ensemble des matières organiques peuvent être digérées de façon anaérobie à l'exception du bois car celui-ci est trop ligneux (29). Les déjections animales apportent une charge bactérienne importante nécessaire au processus de digestion. Les résidus de culture sont des déchets avec un fort taux de matières sèches servant de support aux micro-organismes et ainsi favorisant la méthanisation (18). De plus, cette valorisation par méthanisation doit se réaliser, dans l'idéal, à proximité des parcelles d'où proviennent les déchets. La présence d'un digesteur anaérobie proche des intrants destinés à la méthanisation est nécessaire afin de limiter les coûts économiques et écologiques. Les coûts de transport (fonction du type d'approvisionnement, du mode de transport et des distances parcourues) peuvent être particulièrement élevés (jusqu'à 300 000 euros par an) (30). De plus, le cercle vertueux permis par la digestion anaérobie n'aurait plus lieu d'être si le digesteur se situe à des centaines de kilomètres de la biomasse agricole entraînant une pollution importante due au transport de ces déchets.

→ **Nécessité de l'utilisation de co-substrat pour améliorer le rendement de production de biogaz.** Les déchets agricoles présentent un potentiel méthanogène faible. Il est donc intéressant de réaliser une digestion anaérobie des fumiers par exemple avec d'autres déchets appelés co-substrats (31). Ces derniers sont issus des déchets de l'industrie agro-alimentaires et/ou des collectivités et leur potentiel méthanogène est plus important. La réussite de la co-méthanisation dépend d'une alimentation résultant d'un mélange équilibré et constants d'intrants de natures différentes (14). L'équilibre du mélange consiste notamment à fixer la charge organique et le taux de matières sèches. Les intrants de la méthanisation agricole sont composés de matières minérales, organiques et d'eau (Tableau 4).

Tableau 4. Caractéristiques des déchets issus des activités agricoles (14).

Substrats	Matière sèche (%)	Matière volatile / Matière sèche (%)
Fumier bovin	25 à 40	70
Lisier bovin	5 à 12	75 à 85
Lisier porcin	3 à 8	70 à 80
Fientes de volailles	10 à 30	70 à 80
Paille	70	90

### I.1.3.3. Caractérisation des intrants

Seule la matière organique biodégradable permet la production de biogaz. Par ailleurs, le potentiel méthanogène sera différent suivant le type de matière organique. Les glucides entraînent une faible production de biogaz associées à un taux de méthane moyen (50% du biogaz est constitué de méthane). Les protéines engendrent une forte production de biogaz associée à un taux de méthane très important (75% du biogaz). Enfin, les graisses permettent une forte production de biogaz associée à un taux de méthane important (70% du biogaz) (29).

- Cas du fumier bovin :

Le fumier bovin est l'un des principaux intrants de la méthanisation à la ferme (plus de 40% introduit dans le méthaniseur utilisé dans le cadre de nos expérimentations). Le fumier est un mélange des excréments des animaux et de leur litière usagée (généralement de la paille). Ce mélange donne au fumier une particularité intéressante, celle d'être à la fois un amendement (amélioration de la consistance de la terre) et un engrais (apport de nutriments aux végétaux).

La qualité du fumier destiné à être méthanisé peut être influencée par divers paramètres :

**- Le cheptel et le logement des animaux (niveau de paillage)**

Le fumier peut être divisé en 4 catégories (32) en fonction de son niveau de paillage et ainsi de sa teneur en matière sèche (MS) :

- le lisier (teneur en MS < 6,5%)
- le fumier mou (teneur en MS comprise entre 6,5 et 18%)
- le fumier compact (teneur en MS comprise entre 18 et 25%)
- le fumier très compact (teneur en MS supérieure à 25%)

Plus le fumier est compact, plus le potentiel méthanogène est important car les teneurs en MS et matière organique sont importantes et disponibles pour la dégradabilité de ces dernières au sein du digesteur anaérobie (32).

**- Le mode et la durée du stockage du fumier avant digestion anaérobie**

Le stockage du fumier influence également le potentiel méthanogène du fumier (33). Ainsi, le stockage « aérobic » en tas ou en fosse va diminuer le potentiel méthanogène du fumier. Une autre méthode de stockage, comme l'ensilage, paraît plus adapté pour la préservation du potentiel méthanogène. L'ensilage consiste à conserver le fumier en silo sous conditions humides permettant de maintenir des conditions anaérobies et acides. Enfin le co-ensilage associé à un co-substrat tel que le glucose ou l'amidon serait la technique de stockage la plus appropriée afin de limiter la perte de potentiel méthanogène du fumier (33). Le fumier possède une structure complexe qui va impacter le processus de digestion anaérobie décrit précédemment mais aussi l'effet des pré-traitements.

**Pour appliquer des procédés d'hygiénisation et évaluer leur impact, il sera donc très important de travailler en culture pure mais aussi et surtout sur les matrices complexes que constituent les intrants.**

## **I.1.4. Les digestats agricoles : réglementation et valeur agronomique**

### **I.1.4.1. Retour au sol des digestats et réglementation**

Le digestat possède des propriétés amendantes et fertilisantes importantes. Le retour au sol de ce résidu est une opportunité pour les exploitants agricoles. On distingue sur le plan réglementaire deux types de logiques de retour au sol. Le digestat est soit considéré comme un « déchet » soit comme un « produit ».

- Selon la logique « déchet » il pourra être valorisé par épandage avec, bien sûr, la nécessité de réaliser un plan d'épandage.
- Une homologation ou une normalisation de ce digestat sera nécessaire si l'exploitant souhaite que ce résidu soit considéré comme un « produit ». La sortie du statut de déchet du digestat vers un statut de produit permettra de le considérer comme un résidu commercialisable et donc économiquement plus intéressant.

#### **I.1.4.1.1. Digestat en logique « déchet »**

A la sortie d'un méthaniseur agricole, si le digestat est considéré comme un déchet, il peut être valorisé selon un plan d'épandage. Ce digestat est uniquement destiné à des sols agricoles. Ces sols ne doivent pas être détrempés ou inondés. Il doit être épandu à au moins 500 mètres de zones piscicoles et 200 mètres de lieux de baignade ou de plages (34). En outre, la technique d'épandage doit permettre de limiter les émissions d'ammoniac dans l'atmosphère. Le plan d'épandage est dépendant du régime ICPE dont fait partie le méthaniseur. Hormis les directives citées ci-dessus, les exigences en termes de concentrations maximales en micro-organismes seront différentes entre un méthaniseur soumis à déclaration, enregistrement ou autorisation.

##### **I.1.4.1.1.1. Installation soumise à déclaration**

Lorsque le méthaniseur est soumis à déclaration (quantité de matières traitées inférieures à 30 t/j), l'épandage du digestat doit suivre les directives de l'arrêté du 10 novembre 2009 (19). Un plan d'épandage doit être établi. Une étude préalable est parfois nécessaire lorsque l'installation n'a pas mentionné d'épandage dans son plan d'exploitation. Le régime de déclaration, ne fait mention d'aucune obligation de mesure du contenu microbiologique (*i.e.* micro-organismes pathogènes).

##### **I.1.4.1.1.2. Installation soumise à enregistrement**

L'épandage du digestat issu d'installations soumises à enregistrement (quantité de matières traitées supérieure ou égale à 30 t/j mais inférieure à 100 t/j) est régi par l'arrêté du 12 août 2010 (20). Des analyses microbiologiques du digestat sont nécessaires (Tableau 5).

Tableau 5. Micro-organismes recherchés dans le digestat issu d'une installation soumise à enregistrement (20)

Légende : NPP : Nombre le Plus Probable ; NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes

Micro-organismes	Valeur limite (pour 10 g de matière sèche)
<i>Salmonella sp.</i>	8 NPP
Enterovirus	3 NPPUC
Œufs d'helminthes	3

La réglementation est ainsi plus limitative que pour les installations soumises à déclaration en terme de réglementation sur le contenu microbiologique.

Des dispositions communes relatives à l'épandage existent entre les installations soumises à déclaration et celles à enregistrement. Il est interdit d'épandre sur des sols gelés ou enneigés. Les cultures maraîchères, fruitières, fourragères et les herbages sont des terres où le digestat (issu d'installations soumises à déclaration ou enregistrement) ne peut être épandu. De plus, le digestat liquide est interdit d'épandage sur des sols à forte pente (supérieur à 7%) afin d'éviter le ruissellement vers les cours d'eau. Cet épandage doit par ailleurs être réalisé à une distance minimale de 50 mètres d'un point d'eau potable et à 35 mètres de plans d'eau ou cours d'eau.

#### I.1.4.1.1.3. Installation soumise à autorisation

Les règles d'épandage du digestat, lorsque le méthaniseur est soumis au régime d'autorisation (quantité de matières traitées supérieure ou égale à 100 t/j), sont mentionnées dans l'arrêté du 10 novembre 2009 (19). Cet arrêté, n'a pas les mêmes exigences. Il renvoie à l'arrêté du 2 février 1998 (35) pour les conditions d'épandage.

Le digestat doit toujours démontrer une innocuité sur la santé humaine et animale mais les agents pathogènes recherchés ne sont pas mentionnés. En effet, l'analyse microbiologique est dépendante de chaque installation. Une étude doit ainsi démontrer l'**innocuité** en mentionnant les pathogènes recherchés (et leurs valeurs-limites) dans l'arrêté d'autorisation. Si le digestat respecte toutes ces dispositions, il peut ainsi être épandu sur des cultures fourragères ou des herbages 3 semaines avant la récolte ou la remise à l'herbe des animaux. Il ne peut cependant pas être épandu sur des cultures maraîchères pendant la période de végétation. Son épandage est autorisé sur des cultures maraîchères ou fruitières susceptibles d'être consommées crues 10 mois avant la récolte ou pendant la récolte si l'absence de risque pathogène est démontrée. De plus, l'épandage doit être effectué à distance des cours d'eau et des points d'eau destinés à la consommation. Une distance minimale de 35 mètres est requise si la pente du sol est inférieure à 7%. Si la pente est supérieure à cette valeur, la distance minimale d'épandage est de 100 mètres. Par ailleurs, l'épandage de déchets solides soumis à autorisation n'est pas autorisé sur des sols enneigés ou gelés. Enfin, la technique d'épandage doit limiter les émissions atmosphériques d'ammoniac.

**Le digestat en logique « déchet » nécessite un plan d'épandage avec des directives parfois contraignantes. Si l'exploitant décide de conserver le statut de déchet pour son digestat, il n'obtiendra pas ou peu de bénéfice pécunier avec celui-ci. La majorité des installations de méthanisation sont des dispositifs nécessitant un investissement économique important. C'est pourquoi il serait plus intéressant d'obtenir un digestat ayant le statut de produit. Toutefois, des règles encore plus strictes doivent être respectées pour que le digestat soit dans une logique « produit ». La nécessité de la démonstration de l'innocuité est accrue et constitue souvent un point de blocage. D'où la nécessité de travailler à la mise en œuvre de technologies permettant une hygiénisation des digestats.**

#### **I.1.4.1.2. Digestat en logique « produit »**

Le digestat agricole peut être considéré comme un produit de deux manières différentes. Il peut soit être considéré comme un amendement organique à condition de respecter les critères de la norme NFU-44-051 (36) soit être homologué par l'ANSES afin de faire partie de la famille des matières fertilisantes et supports de culture.

##### **I.1.4.1.2.1. Critères pour que le digestat soit considéré comme un amendement organique en logique produit**

- 1) **Compostage** : le digestat agricole peut intégrer la catégorie des amendements organiques à condition qu'il subisse un compostage dès la sortie du méthaniseur. Le compostage est un traitement aérobie permettant une hygiénisation de la matière grâce à des processus de décomposition et de transformation menés par des populations microbiennes (37). Ces dernières entraînent une augmentation transitoire de la température, une homogénéisation avec perte de masse de la matière compostée. Ce produit final est appelé « compost » s'il respecte les critères de la norme NFU 44-051 (36). Il peut alors être vendu comme n'importe quel amendement organique à condition de respecter des valeurs-limites en agents pathogènes.
- 2) **Teneurs limites en micro-organismes** : des valeurs limites s'appliquent afin d'assurer une innocuité sanitaire (Tableau 6). La teneur en *Salmonella sp.* diffère en fonction du type de culture amendé :

- Absence de *Salmonella* dans 25 grammes de digestat : si l'amendement organique est destiné à des cultures maraîchères.

- Absence de *Salmonella* dans 1 gramme de digestat : si ce dernier est destiné à tout autre type de culture.

Tableau 6. Valeurs limites de la concentration en micro-organismes présents dans les amendements organiques (36).

Micro-organismes	Amendement destiné à toutes les cultures (sauf cultures maraîchères)	Amendement destiné aux cultures maraîchères
<i>Salmonella sp.</i>	Absence dans 1 g	Absence dans 25 g
Œufs d'helminthes	Absence dans 1,5 g	
<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>2</sup> par gramme de matière brute	
Entérocoques	10 <sup>4</sup> par gramme de matière brute	

Une autre voie est possible pour le digestat agricole afin d'accéder au statut de produit. Il s'agit de l'homologation afin que celui-ci fasse partie de la famille des matières fertilisantes et supports de culture ou MFSC.

#### I.1.4.1.2.2. Procédure d'homologation : Critères pour que le digestat soit considéré comme une matière fertilisante

Une procédure stricte est nécessaire pour que le digestat soit considéré comme une matière fertilisante. Ainsi, il doit obtenir une autorisation de mise sur le marché ou AMM. Cette AMM est délivrée par l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail). Pour cela, l'exploitant désirant que le digestat soit considéré comme une MFSC doit présenter un dossier auprès de l'ANSES démontrant que son digestat peut rentrer dans la famille des MFSC au vu des réponses apportées aux directives demandées par l'ANSES (38). Parmi les recommandations exigées par l'organisme national, il est demandé de respecter des critères d'innocuité sanitaire. Des concentrations maximales en micro-organismes sont fixées (Tableau 7). Ces micro-organismes peuvent être pathogènes pour l'homme et les animaux. Il est donc important de respecter ces seuils. **En 2014 (39), un digestat n'a pas pu obtenir l'homologation à cause d'une concentration trop élevée en *Clostridium perfringens*. Ce qui montre bien à quel point la présence de ce micro-organisme pose problème pour la valorisation des digestats.**

Tableau 7. Concentrations maximales en micro-organismes recommandées par l'ANSES dans des MFSC (38)

n = nombre d'échantillons à analyser ; m = valeur-seuil pour le nombre de bactéries ; M = valeur maximale du nombre de bactéries ; c = nombre d'échantillons pouvant se situer entre m et M

Micro-organismes	Cultures					
	Grandes cultures	Arboriculture Viticulture Petits fruits	Gazons Prairies	Sylviculture Pépinières ornementales	Cultures florales	Légumes Fraises
<b>Entérocoques</b>	<10 <sup>4</sup> /g					<100/g
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<10 <sup>3</sup> /g					<100/g
<b><i>Clostridium perfringens</i> (formes végétatives et sporulées)</b>	m = 100 M = 1 000 n = 3 c = 1	m = 10 M = 100 n = 3 c = 1		m = 100 M = 1 000 n = 3 c = 1		m = 10 M = 100 n = 3 c = 1
<b><i>Salmonella</i></b>	Absence dans 1 g					Absence dans 25 g
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>			Absence dans 25 g (prairies)		Absence dans 25 g	
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ou à coagulase +</b>	<10/g					
<b>Œufs ou larves de nématodes</b>	Absence dans 1 g				Absence dans 25 g	

#### I.1.4.1.2.3. Valeurs agronomiques des digestats

Comme indiqué au chapitre I.1.4.1, les digestats présentent, à la fois, des valeurs amendantes et fertilisantes. On parle de digestats au pluriel car les valeurs agronomiques des digestats sont influencées par différents facteurs (3) :

- le type d'intrants introduit dans le digesteur anaérobie,
- le procédé de méthanisation employé,
- les post-traitements appliqués sur ces digestats.

La valeur fertilisante des digestats sera plus importante si des déjections animales sont introduites dans le méthaniseur. A l'inverse, les biodéchets de type « déchets verts » présentent une valeur fertilisante moins importante (18).

Les digestats issus d'une méthanisation en voie sèche présentent une valeur fertilisante plus importante que les méthaniseurs utilisant le procédé en voie humide. A l'inverse, leurs valeurs amendantes seront moins importantes (3).

Le post-traitement couramment appliqué au digestat lors d'une méthanisation en voie humide est la séparation de phase : ce procédé permet d'obtenir une fraction solide servant

d'amendement organique et une fraction liquide servant d'engrais azoté (riche en azote minéral) (40). Cette séparation de phase a peu d'influence sur la teneur en phosphore tandis qu'elle concentre l'azote et le potassium au sein de la fraction liquide (Tableau 8).

Tableau 8. Teneur en éléments fertilisants au sein de digestats issus du monde agricole (40).

	Digestat brut	Digestat solide	Digestat liquide
<b>Teneur en azote N (g/kg MS)</b>	65,20	20,56	52,43
<b>Teneur en pentoxyde de phosphore P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (g/kg MS)</b>	28,36	16,57	19,73
<b>Teneur en oxyde de potassium K<sub>2</sub>O (g/kg MS)</b>	69,92	14,56	48,30

Les digestats possèdent donc des valeurs agronomiques intéressantes (Tableau 8). Ils présentent également une teneur en agents pathogènes moins importante que des substrats « bruts » directement épandus sur des terres agricoles (Tableau 9). En effet, le processus de digestion anaérobie permet une diminution de la concentration en agents pathogènes et la qualité sanitaire des digestats est ainsi plus importante que des déchets agricoles utilisés directement en engrais (40). Le Tableau 9 ci-dessous présente les différences de concentrations en agents pathogènes (en log d'UFC par gramme de matière fraîche (MF)) dans du fumier frais ou méthanisé. Le fumier méthanisé présente une concentration amoindrie en agents pathogènes (effet hygiénisant) et démontre tout l'intérêt de la digestion anaérobie pour obtenir un digestat avec des qualités sanitaires et agronomiques importantes.

Tableau 9. Concentrations en *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Clostridium perfringens* dans du fumier frais et méthanisé (adapté de (41,42)).

Concentration micro-organismes (log UFC/g de MF)	Fumier frais	Fumier méthanisé = « digestat »
<i>Escherichia coli</i>	5 logs	1,9 logs
<i>Enterococcus sp.</i>	4,6 logs	4,6 logs
<i>Clostridium perfringens</i>	4 logs	2,65 logs

#### I.1.4.1.3. Evolutions réglementaires pour les digestats

La valorisation des digestats soit à travers la logique « déchet » ou la logique « produit » est un point crucial pour assurer la pérennité de la filière. Cependant, la réglementation sur la valorisation du digestat de méthanisation agricole a été amenée à évoluer dans les derniers mois (23). Ces textes ont pour objectif de mieux préciser les

éléments nécessaires à l'homologation des digestats, ce qui à terme permettrait à certains exploitants de sortir le digestat de la logique déchet et de le vendre comme un fertilisant. Cette démarche va inévitablement s'accompagner d'une réglementation plus précise et plus stricte sur certains paramètres de ce résidu solide-liquide de méthanisation (notamment les micro-organismes pathogènes). Depuis 2017 en France (43) et 2019 en Europe (44), des textes de lois permettent une valorisation agricole plus simple du digestat. Le digestat agricole n'est ainsi plus soumis à un plan d'épandage s'il respecte le cahier des charges fixé dans l'arrêté (45). De plus, toujours en respectant ce cahier des charges, il pourra être considéré comme une matière fertilisante sans effectuer la procédure d'autorisation de mise sur le marché. Ce cahier des charges vise à harmoniser et simplifier les règles d'innocuité des matières fertilisantes (Figure 10).

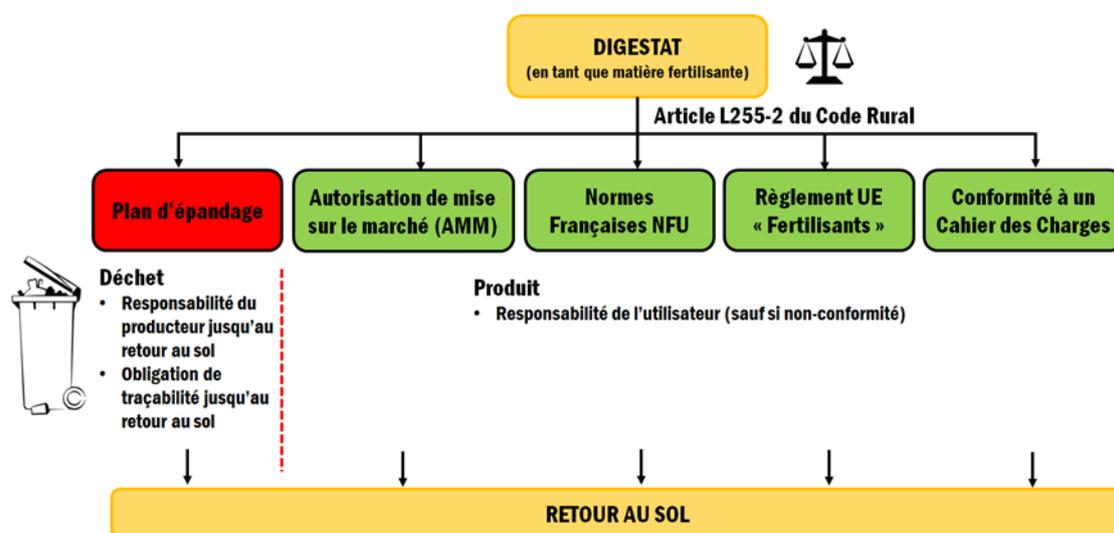


Figure 10. Valorisation du digestat en France (46).

Cependant, le digestat est soumis à l'obtention d'un agrément sanitaire délivré par la préfecture. L'exploitant doit suivre une procédure de type HACCP afin d'identifier tout risque sanitaire et les éviter. Des autocontrôles doivent être effectués afin de respecter les critères d'innocuité mentionnés dans l'arrêté français du 13 juin 2017 (43). Ces critères concernent notamment la teneur maximale en agents pathogènes (Tableau 10). Par ailleurs, l'emploi de ce digestat est soumis à d'autres conditions. Il est considéré comme une matière fertilisante mais ne peut être mélangé à d'autres matières fertilisantes. Il est destiné à être utilisé sur des grandes cultures et des prairies. Les grandes cultures sont des cultures céréalières, oléagineuses, protéagineuses, de pommes de terre ou de betteraves sucrières. Les prairies sur lesquelles ce digestat est utilisé sont destinées à la fauche ou au pâturage. Il ne peut donc être utilisé sur des cultures maraîchères.

Tableau 10. Teneurs maximales en micro-organismes dans le digestat agricole destiné à être utilisé en tant que matière fertilisante en France (43).

n = nombre d'échantillons à analyser ; m = valeur-seuil pour le nombre de bactéries ; M = valeur maximale du nombre de bactéries ; c = nombre d'échantillons pouvant se situer entre m et M

Bactérie	Quantité d'échantillon (en g)	n	m	M	c
<i>Escherichia coli</i> ou <i>Enterococcaceae</i>	1	5	1000	5000	1
<i>Salmonella sp.</i>	25	5	0	0	0

Cette procédure est complétée par une traçabilité stricte. Le digestat considéré comme une matière fertilisante doit être accompagné d'un étiquetage complet et précis mentionnant un grand nombre d'informations.

Cette évolution réglementaire du digestat en France s'est accompagnée d'une évolution de la réglementation européenne. Ainsi, l'Europe adopta en juin 2019 un nouveau règlement sur les fertilisants (Figure 10). Dans ce texte, il est défini qu'un fertilisant européen doit répondre aux exigences d'une « PFC » ou catégorie fonctionnelle de produits et être constitué d'une ou plusieurs matières constitutives ou « CMC ». Il existe 7 familles de PFC et 11 catégories de CMC.

Le digestat agricole, au vu de ce règlement, fait partie de la famille des matières constitutives (CMC). Il n'est plus considéré comme un « déchet ». Pour pouvoir sortir de ce statut de déchet, le digestat doit répondre à un certain nombre de critères précisés par la réglementation européenne. Cette réglementation est plus restrictive que la réglementation française. En effet, concernant les critères microbiologiques, les agents pathogènes recherchés sont identiques à la législation française : *Salmonella sp.* et *Escherichia coli* ou *Enterococcaceae*. Les teneurs autorisées en *Salmonella sp.* sont identiques à la législation française. Cependant, elles diffèrent pour *E. coli* ou les *Enterococcaceae*. La valeur maximale autorisée est de 5000 UFC en France (1000 UFC pour la législation européenne). Concernant les éléments traces minéraux, les textes européens sont aussi plus exigeants que la réglementation française. Par exemple, la teneur maximale en plomb doit être de 120 mg/kg de matière sèche tandis qu'elle est de 180 mg/kg en France. La teneur en nickel ne doit pas dépasser 50 mg/kg selon la réglementation européenne alors que la limite est à 60 mg/kg selon la législation française. Le seul élément dont la teneur maximale exigée est plus faible dans la législation française que dans la législation européenne est l'arsenic. Sa concentration ne doit pas excéder 18 mg/kg selon la loi française tandis qu'un seuil de 40 mg/kg est retenu dans les textes européens.

Cependant, cette réglementation européenne s'applique uniquement lorsque le digestat est destiné à être exporté vers un pays membre de l'Union Européenne. Si le digestat est destiné au marché national, seule la réglementation française est prise en compte.

## I.2. Paramètres de la digestion anaérobie influençant le potentiel hygiénisant

### I.2.1. Micro-organismes indicateurs du potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie

L'essor et le développement continu de la digestion anaérobie nécessite une régulation de la charge en agents pathogènes dans les digestats dans la mesure où ceux-ci sont épandus. Même s'il est illusoire de penser que la concentration en micro-organismes peut être nulle à la sortie du digesteur en jouant simplement sur les paramètres de conduite, il est primordial de tendre vers cet idéal afin d'assurer l'innocuité sanitaire du digestat épandu sur les terres agricoles. Ceci permet ainsi de limiter la propagation éventuelle d'agents pathogènes dans l'environnement et de prévenir le développement de maladies graves voire potentiellement mortelles pour l'Homme et l'animal (47). Il est très difficile de suivre l'évolution de la concentration de tous les micro-organismes présents dans un digesteur. C'est pourquoi, lors des études microbiologiques, les chercheurs se limitent à un certain nombre de pathogènes appelés « micro-organismes indicateurs » (48). Ces agents sont les témoins de la vie microbienne dans les méthaniseurs et permettent de déterminer l'évolution des populations potentiellement infectieuses présentes dans le digestat.

L'Union Européenne propose un certain nombre de critères afin de sélectionner les micro-organismes à étudier (49). Ces micro-organismes doivent être faciles à quantifier, identifier et confirmer. De plus, ils doivent être présents en grand nombre dans l'échantillon à caractériser. Enfin, un micro-organisme peut être considéré comme un indicateur lorsqu'il est aussi thermorésistant que les agents pathogènes qu'il sert à contrôler.

Dans le domaine bactérien des digestats, *Escherichia coli*, les entérocoques et *Clostridium perfringens* répondent à ces critères. Ils permettent de renseigner de façon précise sur le caractère pathogène ou non du digestat qui sera épandu. Il est préférable de rechercher plusieurs micro-organismes pour permettre une étude microbiologique plus exhaustive. Cette standardisation des méthodes permet ainsi de comparer différents travaux de recherche sur une même base scientifique. *Escherichia coli* et les entérocoques sont des indicateurs de contamination fécale couramment étudiés lors de la digestion anaérobie agricole car présents en grand nombre au sein des intrants (47). *Clostridium perfringens* est une bactérie indicatrice de l'efficacité d'un traitement, thermorésistante et représentative d'un grand nombre d'agents pathogènes résistants.

**Lors de la digestion anaérobie, plusieurs paramètres influencent la survie des micro-organismes pathogènes. Ces paramètres, appelés paramètres de conduite, sont :**

**La température,**

**Le temps de séjour,**

**Le pH et les acides gras volatils.**

## I.2.2. Influence des paramètres de conduite des digesteurs sur l'hygiénisation des digestats

La conduite du procédé de digestion anaérobie constitue donc un élément important de la qualité des digestats. En effet, certains paramètres de conduite ont des effets hygiénisants sur le digestat. L'influence de ces paramètres est reportée ci-après, elle est très importante car elle conditionne souvent le mode de mise en œuvre choisi.

### I.2.2.1. Effets de la température de conduite de la méthanisation sur les organismes indicateurs

La température du méthaniseur constitue le paramètre majeur influant sur le potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie. La méthanisation peut s'opérer à différentes températures (13). Trois régimes de température peuvent être utilisés lors de la digestion anaérobie agricole.

A) La méthanisation psychrophile se déroule à une température inférieure à 20°C. Elle est très peu employée car les capacités de digestion anaérobie et la production de biogaz sont faibles à cette température. Le potentiel hygiénisant est notable : des études ont montré un abattement de 6 log de la concentration en coliformes totaux et de 3 log de la concentration en *Salmonella*. Toutefois, ce potentiel hygiénisant est obtenu après une digestion anaérobie psychrophile ayant duré 1 an (50). Par ailleurs, aucun effet sur les entérocoques ou des bactéries plus résistantes telles que *Clostridium perfringens* n'a pu être mis en évidence.

B) La méthanisation mésophile s'effectue à des températures comprises entre 20 et 45°C. En général, la température de travail est de 37°C. Cette température de méthanisation est la plus couramment utilisée car elle présente divers avantages. Elle permet une grande stabilité du processus de digestion anaérobie en termes de production quantitative et qualitative du digestat. De plus, cette gamme de température permet un bon compromis entre la dépense et la production d'énergie. Le potentiel hygiénisant de ce régime de digestion anaérobie est supérieur à celui d'une méthanisation psychrophile car les effets obtenus après plus de 365 jours en régime psychrophile sont obtenus en 40 jours environ avec un régime mésophile. Par ailleurs, un abattement de la concentration en entérocoques peut être observé en régime mésophile (inférieur à 2 logs) contrairement au régime psychrophile (51).

C) On parle de méthanisation thermophile lorsque le digesteur est conduit à une température supérieure à 45°C. Ce régime de méthanisation permet une digestion anaérobie des intrants plus rapides (la phase d'hydrolyse est plus brève) mais avec une stabilité moindre du procédé et une énergie de chauffage plus importante que pour un digesteur mésophile. Cependant, le régime thermophile est celui présentant le potentiel hygiénisant le plus important (52,53). Les coliformes fécaux voient leur concentration diminuer de 2,5 logs en moyenne en régime mésophile tandis que l'abattement est supérieur à 5 logs lorsque la méthanisation s'opère en régime thermophile (52). Une grande partie des micro-organismes pathogènes (indicateurs de contamination fécale tels que *E. coli* et les entérocoques) sont

éliminés à cette température et une faible communauté microbienne peut survivre lors de la méthanisation thermophile.

#### ***1.2.2.1.1. Escherichia coli***

Cette bactérie est un bacille Gram négatif, non sporulé et non capsulé (Figure 11), commensal du tube digestif de l'Homme et de l'animal. Elle est donc couramment présente dans les sous-produits animaux destinés à la digestion anaérobie agricole. Son métabolisme respiratoire aéro-anaérobie facultatif lui permet de résister dans l'environnement. Cette bactérie peut être responsable de diarrhées (ou autres infections intestinales) et d'infections urinaires voire de septicémies (infections extra-intestinales).

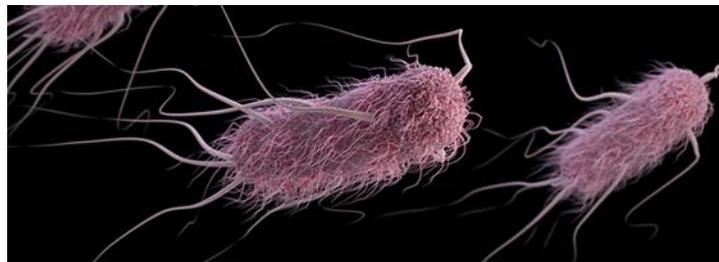


Figure 11. Image de *Escherichia coli* (issu de <https://www.cdc.gov>).

La concentration en *E. coli* sert d'indicateur de contamination fécale au sein de la matière organique. Il est un témoin du pouvoir hygiénisant de la digestion anaérobie lorsque sa concentration diminue. Les effets des conditions mésophiles et thermophiles sur cette bactérie ont été étudiés à l'échelle du laboratoire et en conditions réelles d'exploitation. Les résultats sont reportés dans le tableau 11 ci-dessous. Il convient de noter que la littérature en régime thermophile est cependant nettement moins abondante qu'en conditions mésophiles (moins d'installations).

Tableau 11. Effets de la digestion anaérobie sur l'abattement de la concentration en *Escherichia coli*.

Analyses	Régime de méthanisation	Intrant et conditions	Abattement	Référence
Laboratoire	Mésophile	Fumier bovin pendant 6 jours à 37°C	5 logs	(42)
		Fumier bovin pendant 41 jours à 37°C	6 logs	(54)
		Fumier bovin + digestat agricole	2 logs	(55)
		Fumier bovin + boues déshydratées	7 logs	(55)
	Thermophile	Fumier bovin 40 minutes à 55°C	4 logs	(42)
		Fumier bovin	4 logs	(56)
		Fumier poulet + granulés de bois pendant 35 jours	>5 logs	(57)
		Boues brutes	8 logs	(58)
Sur site	Mésophile	Fumier bovin + céréales	2 logs	(47)
		Fumier bovin	3 logs	(41)
		Lisier de porc + céréales	Total	(47)
	Thermophile	Boues de STEP	6 logs	(51)
		Boues de STEP	4 logs	(59)

**L'influence de la température sur l'abattement de la concentration en agents pathogènes : la digestion anaérobie entraîne une diminution de la concentration en *Escherichia coli*. En laboratoire ou sur site, en conditions mésophiles, l'abattement semble fluctuer en fonction du substrat et de l'inoculum utilisés. En laboratoire ou sur site, en conditions thermophiles, l'abattement de la concentration en *E. coli* est très important.**

#### I.2.2.1.2. Entérocoques

Les entérocoques sont des micro-organismes indicateurs de contamination fécale tout comme *Escherichia coli*. Cependant, ces cocci Gram positif en chaînette (Figure 12) résistent différemment lorsqu'ils sont soumis à divers stress dans l'environnement tels qu'une augmentation de température par exemple (42). Les effets des digestions mésophile et

thermophile sur les entérocoques au laboratoire et à l'échelle industrielle sont reportés dans le tableau 12 ci-dessous.



Figure 12. Image d'entérocoques (issu de <https://www.cdc.gov>).

Tableau 12. Effets de la digestion anaérobie sur l'abattement de la concentration en entérocoques.

Analyses	Régime de méthanisation	Intrant	Abattement	Référence
Laboratoire	Mésophile	Fumier bovin	3 logs	(42)
		Fumier porcin + déchets alimentaires	3 à 7 logs	(55)
		Fumier porcin + déchets alimentaires	2 logs	(60)
	Thermophile	Fumiers bovin + porcin	4 logs	(61)
		Fumier	2 logs	(42)
Sur site	Mésophile	Fumier bovin + déchets agricoles	Aucun	(41)
		Boues de STEP	<2 logs	(51)
	Thermophile	Boues de STEP	>4 logs	(51)

**L'influence de la température sur l'abattement de la concentration en agents pathogènes : la digestion anaérobie entraîne une diminution de la concentration en entérocoques. En laboratoire, il n'est pas démontré une différence notable entre l'abattement observé à 37°C et celui observé à 55°C. Cependant, ce pouvoir hygiénisant est plus important en régime thermophile qu'en régime mésophile lors d'études sur site.**

### 1.2.2.1.3. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* est une bactérie présente sous 2 formes dans l'environnement : la forme végétative, forme bactérienne qui permet sa multiplication en présence de nutriments. Lorsque les conditions environnementales deviennent instables (absence de nutriments par exemple) elle peut résister au sein de cet habitat hostile : les spores (forme de résistance sans possibilité de multiplication) (62). Les résultats obtenus sur les formes végétatives et les spores doivent être considérés séparément car la réponse apportée ne sera pas identique en fonction des formes de *Clostridium* présentes dans un milieu. Certaines études ne font pas la distinction entre les formes végétatives et sporulées de cette bactérie, on parle alors d'études sur les formes totales.

Les effets de la digestion anaérobie mésophile et/ou thermophile sur *Clostridium perfringens* à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle sont reportés dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13. Effets de la digestion anaérobie sur l'abattement de la concentration en *Clostridium perfringens*.

Analyses	Régime de méthanisation	Intrant	Abattement	Référence
Laboratoire	Mésophile	Fumier bovin	>1 log sur les formes totales	(42)
		Boues d'épuration	<1 log sur les spores	(63)
	Thermophile	Fumier bovin	<1 log sur les formes totales	(42)
		Boues d'épuration	<1 log sur les spores	(63)
Sur site	Mésophile	Déchets agricoles	1 log sur les formes totales	(47)
		Fumier bovin	Aucun sur les formes totales	(41)
		Fumier	<1 log sur les formes totales et les spores	(64)
		Déchets agricoles	Aucun sur les formes totales	(65)
		Boues activées	Aucun sur les formes totales et les spores	(51,59,66)
	Thermophile	Déchets agricoles	Aucun sur les formes totales	(65)
		Boues activées	Aucun sur les formes totales et les spores	(51,59,66)

La concentration de *Clostridium perfringens*, dans la majorité des études, n'a pas diminué grâce à la digestion anaérobie. Les expérimentations effectuées en laboratoire ou sur site ont démontré que les deux principaux régimes de méthanisation (mésophile et thermophile) n'ont que très peu d'effets sur *Clostridium perfringens*.

*Clostridium perfringens* est déjà utilisée comme indicatrice de l'efficacité du traitement de l'eau (67). Aux Etats-Unis, elle fait partie de la liste des agents pathogènes à rechercher lors de la réutilisation de l'eau en cas d'usages non potables (68). *Clostridium perfringens* pourrait être utilisée comme témoin de l'efficacité d'un traitement hygiénisant tel que la digestion anaérobie. C'est une des bactéries présentes dans les intrants agricoles destinés à être méthanisés (64). Cette bactérie serait employée pour évaluer l'efficacité de ce processus car elle est facile à cultiver, présente en grand nombre et très résistante en formant des spores (69).

Si la concentration de cette bactérie décroît au cours de la digestion anaérobie, on peut donc supposer que le pouvoir hygiénisant de la méthanisation est considérable (70). Ainsi, en Europe, des projets de loi envisageaient de dénombrer la concentration en spores de *C. perfringens* (71). Cette bactérie serait le témoin de la présence (ou l'absence) d'autres agents pathogènes aussi résistants tels que *Giardia sp.* ou *Cryptosporidium sp.* du fait des similitudes de taille entre les spores et les oocystes. Cependant, Rihmanen *et al.* (72) n'ont montré aucune corrélation entre le dénombrement de *Clostridium* et la présence de *Cryptosporidium sp.* ou *Giardia sp.* Peu de recherches en France se sont intéressées à cet agent pathogène dans les intrants et digestats de la méthanisation (64,73,74). Le Maréchal *et al.* (64) et Pourcher *et al.* (74) ont pu constater que le temps de séjour et la température du digesteur n'avaient aucune influence sur l'abattement de la concentration en *Clostridium perfringens*. Derongs *et al.* (73) ont pu également observer que *C. perfringens* contenu dans le digestat présentait une antibiorésistance. Ce digestat serait donc responsable de graves problèmes de santé publique lorsque celui-ci est épandu sur les terres agricoles.

**L'étude bibliographique montre que la digestion anaérobie mésophile ou thermophile n'a aucun effet sur les formes sporulés de *C. perfringens* donc qu'il est très important d'étudier les formes végétatives et sporulées de *C. perfringens* pour affirmer que le pouvoir hygiénisant de la digestion anaérobie est notable.**

### **I.2.2.2. Impact du temps de séjour dans le méthaniseur sur l'hygiénisation des digestats**

Le temps de séjour correspond au temps passé par le substrat au sein du digesteur (29). Plusieurs études ont montré que les effets hygiénisants pouvaient être accrus par les temps de séjour utilisés, et ce pour une même température de méthanisation.

→ En régime mésophile par exemple, plus le temps de séjour est long dans le digesteur, plus la charge en micro-organismes (*Escherichia coli*) est faible. Toutefois, cette affirmation ne s'applique pas pour *Clostridium perfringens* (47).

→En régime thermophile, un temps de séjour du substrat de 20 jours entraîne un abattement de la concentration en coliformes fécaux plus important qu'un temps de séjour de 4 jours (6 à 7 logs d'abattement pour une durée de 20 jours contre 4 logs environ pour une durée de 4 jours) (52). Cependant, une augmentation encore plus importante du temps de séjour (jusqu'à 60 jours) n'impacte pas la concentration en coliformes fécaux. Les résultats sont comparables à ceux obtenus pour des temps de séjour de 4 jours (52).

**L'influence du temps de séjour sur le potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie est très relatif.**

### **I.2.2.3. Effets hygiénisants du pH et de la concentration en AGV dans le méthaniseur**

Les Acides Gras Volatils (AGV) sont des intermédiaires réactionnels de la méthanisation participant à la production de biogaz. Leur concentration (faible ou importante) influe sur le potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie. La concentration en AGV est directement liée au pH du digesteur.

→Les premières étapes biochimiques de la méthanisation engendrent la production d'AGV (Figure 8). Ces derniers peuvent s'accumuler lors d'un apport trop important en matière facilement biodégradable (14) et ainsi entraîner une augmentation de leur concentration et une baisse de pH du méthaniseur. La méthanogenèse (dernière étape biochimique) est alors inhibée et le processus de digestion anaérobie est perturbé, entraînant la chute du rendement de production de biogaz et une chute du potentiel hygiénisant qui devient faible voire nul.

→Si une forte concentration en AGV a une influence négative sur le procédé de digestion anaérobie en général, il peut être intéressant, en revanche, d'utiliser des ajouts dosés d'AGV. En effet, de nombreuses études démontrent que les AGV ont un effet toxique sur certaines bactéries pathogènes (66,75). Ten Brummeler *et al.* (76) et Kunte *et al.* (77) ont mené des investigations sur la survie d'agents pathogènes au sein de digesteurs mésophiles avec ajout d'AGV à différentes concentrations dans le méthaniseur. Pour Ten Brummeler *et al.* (76), le pic d'inactivation de *Salmonella typhimurium* correspond à une concentration en AGV en mélange dont la composition est la suivante : acides acétique à 4 g/L, propionique à 2 g/L et butyrique à 1 g/L. Dans la seconde étude (77), un des digesteurs contenait une concentration en AGV volontairement élevée (9 g/L) alors que pour une digestion anaérobie mésophile classique la concentration en AGV se maintient aux alentours de 0,7 g/L. Dans le digesteur contenant la plus forte concentration en AGV, les entérobactéries ont été plus rapidement inactivées que celles présentes dans le digesteur sans ajout externe d'AGV (réacteur témoin).

Une autre étude menée en laboratoire (78) a montré que l'influence des concentrations en AGV sur l'élimination de *Salmonella sp.* était aussi liée à la température. En régime mésophile, l'ajout d'un mélange d'AGV (mélange équimolaire d'acides acétique, propionique et butyrique à 0,75 g/L, 1,5, 3 et 6 g/L) a un faible impact sur l'abattement de la concentration en *Salmonella* alors qu'en régime thermophile, dans des conditions similaires d'ajout d'AGV, ceci entraîne un effet plus marqué sur l'élimination de *Salmonella* dont la concentration se situait sous la limite de détection.

**Le pH permettant un potentiel hygiénisant optimal se situe autour de la neutralité (13). Entre 6,5 et 8,5, les différentes étapes biochimiques de la méthanisation se succèdent et la digestion anaérobie peut idéalement exprimer son potentiel hygiénisant. La combinaison AGV-température se révélerait donc être une association particulièrement intéressante pour obtenir un potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie optimal.**

### I.3. Pré-traitement des intrants

L'ensemble des micro-organismes indicateurs permet d'obtenir un spectre large des différents agents pathogènes potentiellement présents dans la matière organique. Ces trois bactéries (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* et les entérocoques) ont ainsi été étudiées lors des différentes expérimentations effectuées lors de cette thèse. La littérature a permis de montrer que la digestion anaérobie présentait un pouvoir hygiénisant sur certaines espèces bactériennes. Toutefois, cette hygiénisation n'est pas toujours suffisante pour respecter les règles sanitaires en vigueur concernant le digestat.

De nombreuses études sont consacrées à la mise en place d'un pré-traitement des intrants avec, au départ, l'objectif d'atteindre une augmentation du rendement de production de méthane. Dans certains cas, ces traitements ont aussi permis une hygiénisation partielle ou totale de l'intrant et du digestat obtenu. Au fil des années, les pré-traitements des intrants ont eu pour objectif d'hygiéniser la matière organique entrante dans le digesteur. La littérature est abondante sur le sujet. Les pré-traitements physiques et chimiques sont ainsi mis en œuvre avec plus ou moins de succès.

#### I.3.1. Pré-traitements physiques

L'effet hygiénisant de pré-traitements physiques a particulièrement été étudié sur des matrices de type boues activées avant digestion anaérobie.

- Les micro-ondes : appliquée à des boues de STEP (primaires ou activées), cette technologie a permis diminuer de 6,8 log les coliformes fécaux (79). Des résultats quasi identiques (5,6 log) ont été observés pour des coliformes présents dans ce même type de boues (80) (Tableau 14). Une destruction complète des coliformes a été mise en évidence dans des boues d'épuration issues d'une industrie agro-alimentaire (IAA) (81). Cependant, comme le montre le tableau 15, les taux d'abattelements obtenus sur les coliformes fécaux et sur *Salmonella sp.* varient fortement d'une étude à l'autre probablement à cause de l'utilisation de matrices différentes et/ou de puissances différentes. Une réduction de la teneur en coliformes d'un facteur de 4 log a pu être montré dans des boues primaires (82). Un abattement de la concentration en coliformes encore moins important (2 log) a été obtenu dans des boues activées (83). Un abattement identique de la concentration en *Salmonella sp.* dans des boues activées a également été rapporté (82).

Les micro-ondes entraînent une dégradation de la membrane cellulaire de la bactérie pour entraîner sa destruction. Il a aussi été démontré qu'elles agiraient également sur l'activité bactérienne en diminuant la quantité d'ADN bactérien.

Tableau 14. Effet des traitements micro-ondes sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
Boues de STEP	2450 MHz (jusqu'à 90 secondes)	Coliformes	5,6 à 6,8 log	(79,80)
Déchets IAA	2450 MHz (jusqu'à 90 secondes)	Coliformes	Total	(81)
Boues primaires	2450 MHz (jusqu'à 110 secondes)	Coliformes	4 log	(82)
Boues activées	2450 MHz (jusqu'à 540 secondes)	Coliformes	2 log	(83)
	2450 MHz (jusqu'à 110 secondes)	<i>Salmonella sp.</i>	2 log	(82)

- Les ultrasons : la technologie utilisant les ultrasons est un autre pré-traitement physique pouvant être appliqué sur des intrants destinés à être méthanisés. Les ultrasons entraîneraient une cavitation conduisant à une augmentation de chaleur et de pression (84). Dans le tableau 15 sont reportés quelques résultats de tests réalisés sur des boues activées. Ce pré-traitement présente un pouvoir hygiénisant sur les coliformes fécaux avec des taux d'abattement variant de 1 log (83) à 3 log (85). Enfin, Ruiz-hernando *et al.* (84) obtiennent un abattement inférieur à 1 log de la concentration en *Escherichia coli*.

Ce traitement détruirait la membrane des bactéries mais ceci resterait à confirmer par d'autres études (84).

Tableau 15. Effet des traitements ultrasons sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
Boues activées	2450 MHz pendant 20 minutes	Coliformes	3 log	(85)
	2450 MHz pendant 10 minutes		1 log	(83)
	2450 MHz	<i>Escherichia coli</i>	< 1 log	(84)

- Les hautes pressions : l'application d'une haute pression est également une technique utilisée en hygiénisation. Toutefois, peu d'études se sont intéressées à ce mode de traitement sur des intrants de digestion anaérobie (86). Il n'a été observé aucun abattement de la concentration en *Escherichia coli* dans des boues de station d'épuration après un traitement à 2800 kPa pendant 23 heures.

La haute pression est souvent employée en association avec la chaleur et sur des cultures pures bactériennes sporulantes (cf chapitre I.4.3.1).

- Champs électriques pulsés : cette technologie qui consiste à appliquer des champs électriques répétés pendant une courte durée sur des bactéries est en plein essor. Les résultats obtenus sur des boues activées et sur des SPAN sont reportés dans le tableau 16 ci-après. Un abattement de 1,4 log sur *Salmonella sp.* dans des boues activées a pu être démontré (87). Plus récemment (48), les champs électriques pulsés ont été utilisés pour pré-traiter des sous-produits animaux (SPAN). Des abattements respectifs de 4 et 5 log de la concentration en *E. coli* et *Enterococcus faecalis* ont été atteints. Les champs électriques pulsés (comme la haute pression) peuvent être associés à la chaleur (chauffage ohmique) afin d'obtenir des effets encore plus importants sur les indicateurs de contamination fécale. Ainsi, par ce couplage les abattements des concentrations en *E. coli* et *E. faecalis* ont pu être augmentés à des valeurs respectivement supérieures à 7 et 5 log (48).

Ces champs électriques pulsés entraîneraient des lésions membranaires irréversibles responsables de la mort bactérienne.

Tableau 16. Effet des champs électriques pulsés sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
Boues activées	0,6 kV/cm	<i>Salmonella sp.</i>	1,4 log	(87)
SPAN	25 kV/cm	<i>Escherichia coli</i>	4 log > 7 log si couplage avec chaleur	(48)
	25 kV/cm	<i>Enterococcus faecalis</i>	5 log > 5 log si couplage avec chaleur	

- Les pré-traitements thermiques : les effets de différents traitements thermiques pour hygiéniser les intrants de méthanisation sont reportés dans le tableau 17. Il s'agit, la plupart du temps, de reproduire le process de pasteurisation utilisé en agro-alimentaire. Le traitement thermique peut agir à différents endroits de la bactérie (88) :
  - Membrane : ce traitement peut engendrer une perte d'intégrité membranaire responsable de l'inactivation bactérienne.
  - Protéines : la chaleur est responsable d'une dénaturation des protéines pouvant entraîner la mort bactérienne.
  - Acides nucléiques : le traitement thermique peut causer une dénaturation létale de l'ADN bactérien des agents pathogènes.

Comme évoqué dans le chapitre I.1.3, certaines catégories d'intrants doivent, sur le plan réglementaire, subir une étape de traitement thermique de type de pasteurisation (70°C pendant 1 heure) avant de pouvoir être méthanisés. Ce pré-traitement est efficace contre certaines bactéries. Les coliformes et *Salmonella sp.* présents dans des boues de station d'épuration ne résistent pas à la pasteurisation (89). Des bactéries fécales sont naturellement présentes dans du fumier bovin. Le pré-traitement thermique à 70°C permet de diminuer respectivement de 2,6 log et de 1,77 log la teneur en *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* après 2 minutes ou 1 jour de traitement (42) (Tableau 17). La pasteurisation permet de détruire l'ensemble des entérocoques et *E. coli* présents dans du lisier porcin (74).

Un pré-traitement plus long et à une température plus basse que lors de la pasteurisation, soit 24 heures à 55°C, entraîne une diminution de la concentration en *Clostridium perfringens* dans des boues activées (66) (Tableau 17).

La littérature montre assez clairement que les pré-traitements thermiques n'ont aucun effet sur certains agents pathogènes présents dans la matière destinée à être méthanisée : comme les œufs d'helminthes contenus dans des boues de station d'épuration (89) et les spores de *Clostridium perfringens* présents dans du lisier de porc qui résistent à la pasteurisation (74).

Tableau 17. Effet des traitements thermiques sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
Boues de STEP	1 heure à 70°C	Coliformes	Total	(89)
	1 heure à 70°C	<i>Salmonella sp.</i>		
Fumier bovin	2 minutes à 70°C	<i>Escherichia coli</i>	2,6 log	(42)
	1 jour à 70°C	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,77 log	
Lisier porcin	1 heure à 70°C	<i>Escherichia coli</i>	Total	(74)
	1 heure à 70°C	Entérocoques		
Boues activées	24 heures à 55°C	<i>Clostridium perfringens</i>	< 0,5 log	(66)
Boues de STEP	1 heure à 70°C	Œufs d'helminthes	Aucun effet	(89)
Lisier porcin	1 heure à 70°C	Spores de <i>Clostridium perfringens</i>		(74)

### I.3.2. Pré-traitements chimiques

Les pré-traitements chimiques consistent en l'ajout d'acides ou de bases générant une modification du pH de l'intrant traité.

- L'emploi de bases fortes : les résultats d'hygiénisation obtenus par alcalinisation de l'intrant avec des bases fortes (NaOH) sont reportés dans le tableau 18. L'alcalinisation de boues activées à un pH de 12,4 engendre 4 log d'abattement de la concentration en *E. coli* (84). Un milieu basique permet également d'abattre totalement la concentration en coliformes, streptocoques fécaux et *Salmonella sp.* dans des boues épaissies (90).

Cette alcalinisation serait responsable de la destruction de la membrane cellulaire couplée à une hydrolyse des protéines et acides nucléiques. Cependant, les pH appliqués sont incompatibles avec le processus de méthanisation.

Tableau 18. Effet des traitements alcalins sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
Boues activées	pH initial de 12,4 avec 157 g NaOH/kg de matière pendant 1 jour	<i>E. coli</i>	4 log	(84)
Boues épaissies	pH initial de 10 ou 12 avec une concentration en NaOH de 4 mol/L pendant 2 jours et demi	Coliformes	Total	(90)
		Streptocoques fécaux		
		<i>Salmonella sp.</i>		

- L'emploi d'acides forts : les résultats d'hygiénisation obtenus par acidification de l'intrant avec des acides forts (HCl) sont reportés dans le tableau 19. L'acidification d'un milieu permet aussi une hygiénisation de la matière méthanisable. Un pH proche de 2, obtenu grâce à l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl) dans des boues activées permet la diminution de la concentration en *E. coli* d'environ 3 log (91). De plus, ce pré-traitement permet de détruire totalement *Salmonella sp.* (91). Une autre étude montre que lorsque le pH du milieu atteint 3 après ajout de HCl, on observe une diminution d'environ 30% de la concentration bactérienne en *Clostridium sp.* dans des boues d'épuration (92).  
De la même manière que pour le traitement des intrants par des bases fortes, l'utilisation d'acide fort ne permet pas une méthanisation consécutive à cause des faibles valeurs de pH.

Tableau 19. Effet de traitements avec des acides forts sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
Boues activées	Milieu à pH = 2 avec acide chlorhydrique pendant 24 heures	<i>E. coli</i>	3 log	(91)
		<i>Salmonella sp.</i>	Total	
Boues de STEP	Milieu à pH = 3 avec acide chlorhydrique pendant 24 heures	<i>Clostridium sp.</i>	30%	(92)

- L'utilisation d'acides organiques : des mélanges d'AGV ou des AGV seuls ont été employés pour entraîner un effet bactéricide ou bactériostatique dans différentes matrices. L'objectif est d'atteindre et de perturber directement la machinerie cellulaire des agents pathogènes (93). Ces acides faibles se retrouvent majoritairement sous forme moléculaire (AH) lorsque le pH est inférieur à  $pK_a - 1$  et sous forme ionisée ( $A^-$ ) lorsque le pH est supérieur à  $pK_a + 1$  (Figure 13). Lorsque le pH est compris entre  $pK_a - 1$  et  $pK_a + 1$ , les formes moléculaire et ionisée coexistent. Les AGV peuvent pénétrer dans les bactéries afin d'entraîner des effets bactéricides ou bactériostatiques uniquement lorsqu'ils sont sous forme moléculaire (AH) (Figure 13). Les AGV, étant liposolubles, peuvent traverser la membrane des bactéries et s'accumuler dans le cytoplasme (75). Ils se retrouvent alors au contact d'un environnement neutre ce qui favorise la dissociation en anions et protons ( $H^+$ ) (Figure 14). Les bactéries utilisent des pompes d'efflux actif afin d'expulser ces protons pour maintenir un pH intracellulaire constant. Ces pompes d'efflux consomment de l'ATP et donc de l'énergie (94). La bactérie se retrouve ainsi plus sensible à d'autres traitements appliqués à la suite des AGV. Ces acides organiques, en libérant ces protons dans le cytoplasme, peuvent également agir sur le pH cytoplasmique et altérer les enzymes, les protéines et l'ADN bactérien (Figure 14).

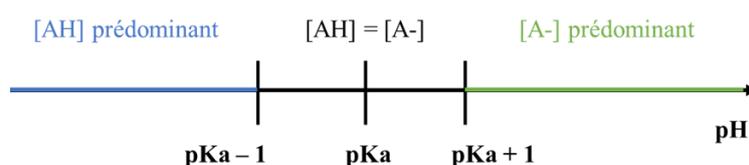


Figure 13. Diagramme de prédominance des espèces en fonction du pH du milieu.

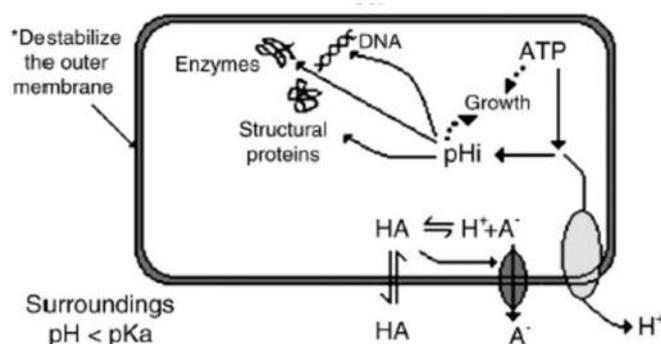


Figure 14. Mécanisme d'action des acides organiques sur les bactéries (75).

L'acidification de sous-produits animaux (Tableau 20) par l'ajout d'acide formique durant au moins 24 heures provoque un abattement d'1 log de la concentration en *Clostridium sporogenes* (95). Un abattement identique de la concentration en entérocoques et *E. coli* a été mis en évidence en traitant des boues activées avec de l'acide peracétique pendant 1 heure (96).

Tableau 20. Effet des traitements avec des acides organiques sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
SPAN	Milieu à pH = 4 avec acide formique pendant 24 heures	<i>Clostridium sporogenes</i>	1 log	(95)
Boues activées	Acide peracétique à 1,5 mg/L pendant 1 heure	<i>E. coli</i>	1 log	(96)

### I.3.3. Effets du couplage de pré-traitements physiques et chimiques

Le couplage de pré-traitements physique et chimique produit des effets hygiénisants plus importants sur les intrants que lorsqu'ils sont appliqués seuls. En effet, ce couplage permet d'obtenir des effets synergiques (97).

L'effet de l'ajout d'acides organiques en couplage avec un traitement thermique sur des intrants de méthanisation est reporté dans le tableau 21. Bauza *et al.* (95) ont étudié l'effet de ce couplage sur des sous-produits animaux traités à l'acide formique pendant 48 heures puis « pasteurisés » (70°C pendant 1 heure). Dans cette étude, l'augmentation de la température de traitement à 80°C voire 90°C (toujours en couplage avec de l'acide formique en amont) a permis de passer d'une diminution d'1 log à un abattement supérieur à 4 log de la concentration de *Clostridium sporogenes*. L'acide acétique est également employé pour pré-traiter chimiquement des boues activées (66) ou des aliments (97). Cet acide organique couplé à la chaleur présente de forts pouvoirs hygiénisants (Tableau 21). On observe une diminution importante de la concentration en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* (97) et *Clostridium perfringens* (66).

Tableau 21. Effet des traitements physico-chimiques sur la concentration en agents pathogènes.

Matrice	Caractéristiques du traitement	Micro-organisme	Abattement	Référence
SPAN	Acide formique + 1 heure 70°C	<i>Clostridium sporogenes</i>	1 log	(95)
	Acide formique + 1 heure 90°C		4 log	
Aliments	Acide acétique + chaleur	<i>E. coli</i>	1,9 à 5,7 log	(97)
		<i>Salmonella typhimurium</i>	3,9 à 5,9 log	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	2,2 à 6 log	
Boues activées	Acides acétique, propionique, butyrique + chaleur	<i>Clostridium perfringens</i>	> 0,5 log	(66)

L'une des explications de l'efficacité de ce couplage réside dans le processus suivant : les acides organiques, ajoutés en premier, traversent la membrane bactérienne afin d'acidifier le cytoplasme. Ce cytoplasme bactérien nouvellement riche en protons va obliger l'agent pathogène à utiliser énormément d'énergie afin d'expulser ces protons pour rétablir l'homéostasie. Les bactéries se retrouvent ainsi particulièrement sensibles à tout nouveau traitement. Ainsi, l'application d'un traitement physique postérieur (ou simultané) au traitement chimique va détruire plus facilement les agents bactériens (75).

**La bibliographie montre que la majorité des études traitant de ce type de couplage porte principalement sur les boues de station d'épuration. La littérature sur les autres types d'intrants est plus rare et nécessite donc des investigations supplémentaires. Il existe notamment peu de données concernant les effets d'un tel couplage sur d'autres matrices complexes telles que les intrants de méthaniseurs agricoles (fumiers, lisiers, déchets de céréales). Enfin si ce couplage se révèle particulièrement efficace sur les indicateurs de contamination fécale tels que *Escherichia coli* et *Enterococcus sp.*, il l'est beaucoup moins sur d'autres types de bactéries à fort pouvoir pathogène telles que *Clostridium perfringens*. Des optimisations du procédé de couplage pourraient permettre d'obtenir des effets plus conséquents sur ces dernières.**

## **I.4. Hygiénisation des substrats et *Clostridium perfringens***

### **I.4.1. Caractéristiques de *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* est une bactérie qui se développe naturellement dans les milieux organiques riches, anaérobies et à 37° C. Cependant, sa température de croissance optimale est comprise entre 43 et 45°C (98). Cette bactérie présente un métabolisme respiratoire anaérobie strict mais est aérotoleérante (62). C'est une des nombreuses bactéries participant au processus de digestion anaérobie (64). Ce bacille Gram positif peut se présenter sous deux formes dans l'environnement : la forme végétative qui est la forme permettant la croissance et la multiplication de la bactérie et la forme sporulée qui est la forme de résistance. Par ailleurs, ce micro-organisme peut causer des maladies graves voire mortelles chez l'Homme et l'animal. Le pouvoir infectant de *Clostridium perfringens* est dû à sa capacité à synthétiser diverses toxines potentiellement létales (99). Une des toxines souvent responsables de pathologies graves chez l'Homme est l'entérotoxine CPE, libérée dans l'intestin grêle, responsable d'intoxications alimentaires (100) La gangrène gazeuse est une autre pathologie pouvant être contractée par l'Homme lors d'un contact avec *C. perfringens* (101). Cette myonécrose à clostridies se développe lorsque des spores sont en contact avec des tissus lésés chez l'Homme. Ainsi, les spores vont germer pour devenir des formes végétatives capables de libérer des toxines dégradant les tissus. Cette pathologie constitue une urgence médicale et une thérapie lourde est nécessaire pour la vaincre. La présence de *C. perfringens* dans les digestats agricoles constitue donc un danger microbiologique potentiel.

Les bactéries du genre *Clostridium* possèdent une capacité importante d'adaptation à l'environnement dans lequel elles vivent. *C. perfringens* peut résister lorsqu'il est soumis à un stress ou privé de nutriments. Grâce à la sporulation, la forme végétative se transforme en une forme sporulée (de résistance). Elle peut rester dans cet état de dormance pendant plusieurs années (101). Cette forme atypique que peut prendre la bactérie ne lui permet pas de se multiplier mais lui permet ainsi de survivre à des conditions environnementales extrêmes (102). Lorsque les conditions environnementales évoluent favorablement, ces spores, grâce à la germination, se retrouvent sous formes végétatives (103).

Par ailleurs, la phase de sporulation d'une bactérie est un phénomène très étudié pour comprendre les mécanismes mis en jeu. Cette compréhension est nécessaire pour tenter d'empêcher la survie de la bactérie pathogène dans le cadre de la méthanisation. Les formes végétatives sont généralement éliminées grâce à une température supérieure ou égale à 60°C tandis que les formes sporulées peuvent résister à des températures allant jusqu'à 100°C (62).

### **I.4.2. La sporulation : un processus complexe**

Un certain nombre de bactéries peuvent résister dans l'environnement à des conditions extrêmes grâce à leur capacité de sporulation. Ce passage de la forme végétative (active) à la forme sporulée (forme en « dormance ») est possible pour *Clostridium perfringens* (Figure 15). Cette dernière, en fonction des facteurs environnants, pourra initier ce phénomène de sporulation. Des facteurs, appelés facteurs modulateurs, pourront également influencer la sporulation. Ce processus est complexe car plusieurs étapes sont nécessaires à la formation d'une spore à partir de la forme végétative. De plus, cette spore, une fois formée, présente un degré de résistance différent en fonction de sa composition. Lorsque les conditions

redeviennent favorables (présence de nutriments), cette spore a la capacité de repasser sous forme végétative. Ce phénomène est appelé germination. Ainsi, la bactérie pourra de nouveau croître et proliférer dans l'environnement.

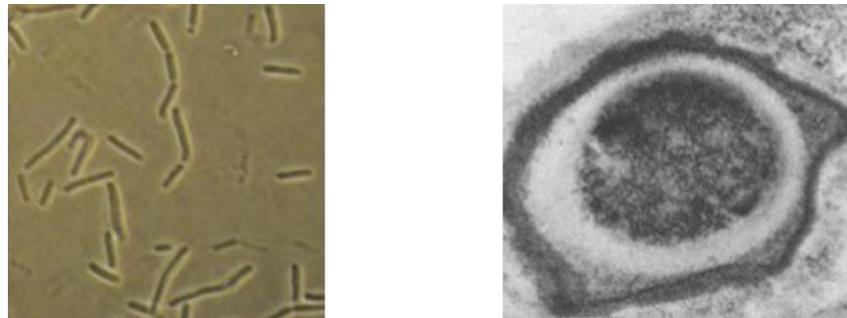


Figure 15. Image de formes végétatives (à gauche, grossissement \*1000) et d'une spore de *Clostridium perfringens* (à droite, grossissement \*40 000) (98,99).

#### I.4.2.1. Facteurs influençant la sporulation

Les facteurs influençant la sporulation sont principalement des facteurs environnementaux. On distingue au sein de ces derniers les facteurs d'initiation et les facteurs de modulation de la sporulation (104). Ces facteurs environnementaux influencent également la composition de la structure des spores (105) engendrant une capacité de résistance différenciée en fonction de l'environnement dans lequel se trouvent les formes sporulées (106). Par ailleurs, ces facteurs peuvent affecter la qualité de germination lorsque les conditions redeviennent favorables pour un développement de formes végétatives.

##### Facteurs initiateurs de la sporulation

Les facteurs initiateurs de la sporulation sont influencés par les facteurs environnementaux. La diminution de nutriments ainsi que la densité cellulaire sont les principaux facteurs environnementaux responsables de l'initiation de la sporulation de *Clostridium perfringens*. Ainsi, la diminution de nutriments nécessaire à la croissance des formes végétatives va initier la sporulation. Ceci déclenche l'induction du phénomène de sporulation des bactéries. Une diminution de la concentration en GTP est observée au sein des *Clostridium* végétatifs. Ceci entraîne une augmentation de la production de Spo0A permettant ainsi l'induction de la sporulation. Une protéine est primordiale pour une sporulation efficace de *C. perfringens* : la CcpA (107) (Figure 16). Cette dernière doit être présente au cours de l'initiation de la sporulation de *Clostridium perfringens* et agit positivement sur Spo0A. Un autre facteur initiateur de la sporulation est la densité cellulaire. Les bactéries, grâce au phénomène de quorum sensing, communiquent. Ce quorum sensing permet de renseigner les micro-organismes de la densité bactérienne présente dans un environnement proche. Ce quorum sensing permet ainsi le déclenchement de réactions en cascade d'histidine kinase entraînant la phosphorylation du Spo0A (106). Le facteur Spo0A phosphorylé est ainsi activé. Ce dernier va entraîner une production de facteurs sigma (facteurs de régulation) nécessaire à la maturation des spores (Figure 16).

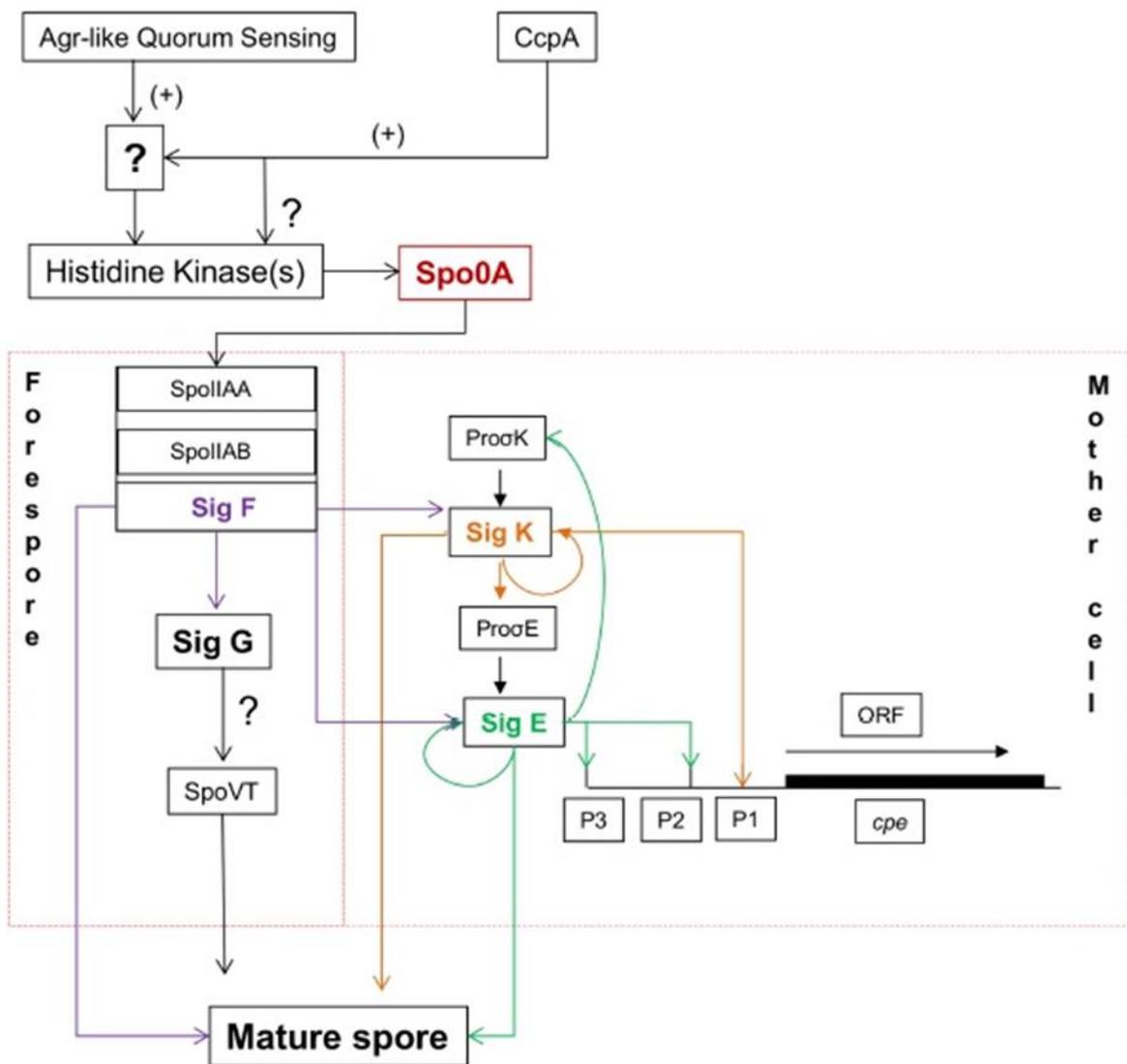


Figure 16. Facteurs responsables de la sporulation de *Clostridium perfringens* (adapté de (106)).

### Facteurs modulateurs de la sporulation

Un des facteurs de modulation principal est la température (Tableau 22). Des spores formées à des températures élevées (42°C) seront plus résistantes à des traitements thermiques que des spores formées à des températures plus faibles (26°C) (106). De plus, de faibles températures, entraînent une sporulation moins conséquente et un processus de formation plus long (108). La température optimale de croissance de la bactérie considérée (*Bacillus sp.* par exemple) serait également sa température optimale de sporulation (109). La présence d'oxygène (Tableau 22) est aussi un facteur de modulation : elle accélère le processus de sporulation de *C. perfringens*.

De plus, l'activité de l'eau a un impact sur la sporulation : une faible activité peut inhiber la sporulation tandis qu'une forte activité améliore la sporulation (108). L'intensité lumineuse est un facteur de modulation de la sporulation : une forte intensité lumineuse diminuerait la concentration finale en spores. Enfin, le pH du milieu module la sporulation. Un pH égal à 7

constitue le pH optimal pour une concentration en spores de *C. perfringens* maximale (108). Une diminution de pH entraîne une diminution du rendement de la sporulation. Le mécanisme d'action reste toutefois, de nos jours, encore mal connu. Enfin, la présence d'autres micro-organismes et de minéraux dans l'environnement proche constitue un facteur de modulation de la sporulation (104). Ce phénomène de sporulation est gourmand en énergie et nécessite donc une quantité suffisante de nutriments dans l'environnement. La compétition bactérienne entre différents agents pathogènes pour se nourrir affecterait ainsi la sporulation de *Clostridium perfringens*.

Tableau 22. Facteurs modulateurs de la sporulation.

Facteurs modulateurs de la sporulation	Référence
Température	(109)
Oxygène	(104,108)
Activité de l'eau	
Intensité lumineuse	
pH	
Présence de minéraux	
Autres bactéries	

#### I.4.2.2. Etapes de la sporulation

Il existe sept étapes de la sporulation notées de I à VII (110) (Figure 17). Le stade 0 correspond à la croissance des formes végétatives.

Lors des étapes I et II, il y a réplication puis condensation de l'ADN. Cet ADN s'étend sur toute la longueur du cytoplasme bactérien pour former un filament chromatique axial. Lors du stade II, une division cellulaire asymétrique se produit pour former une préspore (petit compartiment) et la cellule mère (grand compartiment). Un des deux génomes se place à un pôle de la bactérie et un septum de sporulation, lors du stade II, cloisonne l'ADN situé à ce pôle. Le septum disparaît et la préspore composée d'une membrane externe et d'une membrane interne se forme lors du stade III.

Le stade IV est marqué par la synthèse par la couche de peptidoglycane de petites protéines acido-solubles et d'acide dipicolinique et du cortex situé entre la membrane interne et la membrane externe. Enfin, le stade V permet la formation du manteau sporal et la maturation de la spore.

Lors du stade VI, il y a acquisition par la spore de la résistance aux UV et à la chaleur et elle est libérée lors du stade VII par lyse de la bactérie (Figure 17). Cet état de sporulation peut durer plusieurs dizaines d'années (111). Ces étapes de la sporulation sont communes à l'ensemble des bactéries capables de sporuler telles que *Bacillus sp.* ou *Clostridium sp.* Toutefois, concernant *Clostridium perfringens*, il n'y pas de formation d'exosporium lors du stade IV (106).

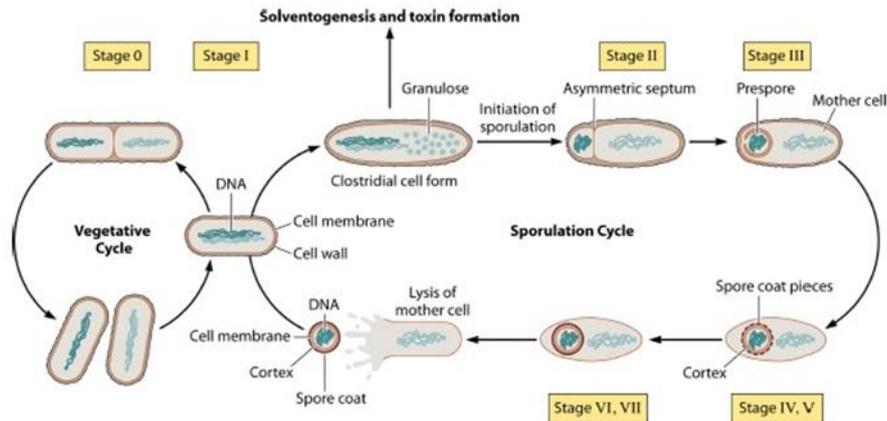


Figure 17. Cycle de sporulation de *Clostridium* sp. (112).

### I.4.2.3. Structure de la spore

Les spores sont constituées d'un noyau contenant le génome bactérien protégé par une paroi sporale (Figure 18). Ce protoplaste ou partie centrale est enveloppé par des tuniques interne et externe. La tunique interne renferme les composés nécessaires à la germination (passage de la forme sporulée à la forme végétative) (110). Entre ces deux tuniques, on retrouve le cortex (113). Celui-ci confère la résistance à la chaleur et aux agents chimiques de la spore (106). Ce cortex renferme également les peptidoglycanes responsables de l'état de dormance de la spore (114).

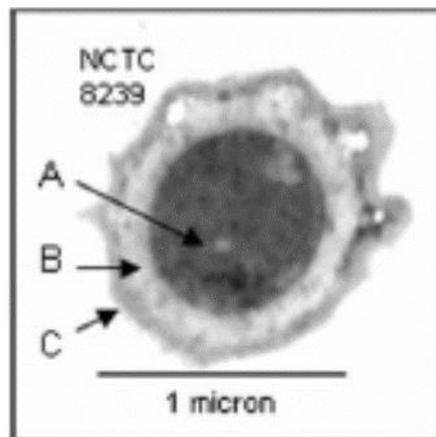


Figure 18. spore de *Clostridium perfringens* (115).

A : cœur de la spore ; B : couche de peptidoglycane ; C : paroi sporale.

De plus, les spores possèdent un complexe composé de dipicolinate de calcium et de petites protéines acido-solubles localisé au centre de celles-ci. Cette association, absente des cellules végétatives, leur permet aussi de résister à la chaleur, aux rayonnements ultra-violet (116). Elle induit également une déshydratation du contenu de la spore. Les spores sont donc des composés particulièrement résistants. Cette résistance est également associée à une durée de vie extrêmement longue. Celles-ci peuvent entrer en état de dormance et résister ainsi de nombreuses années (117).

#### **I.4.2.4. Facteurs sensibilisant la résistance de la spore**

Lorsque les spores sont formées, elles développent des mécanismes de résistance plus ou moins importants en fonction de leur composition interne (106). Des spores dont le cœur présente une teneur en eau importante est plus sensible à des attaques extérieures qu'une spore renfermant une faible teneur en eau. Cette forte hydratation peut entraîner une liaison des protéines acido-solubles à l'ADN de la spore moins importante. Ainsi, la spore se retrouve plus sensible à la chaleur, aux radiations UV ou aux traitements chimiques.

De plus, une importante concentration en acide dipicolinique, prenant la place de l'eau, au sein de la spore lui confère une forte résistance aux traitements thermiques (105). Les protéines acido-solubles fortement liées à l'ADN permettent une résistance accrue des spores dans l'environnement. Il existe différentes familles de petites protéines acido-solubles notées de 1 à 4. Lorsque les spores présentent des taux réduits en protéines 1, 2 et 3, celles-ci sont plus sensibles à la chaleur, aux traitements chimiques et UV (106). Par ailleurs, les acides aminés des protéines acido-solubles 4 jouent un rôle sur la résistance de la spore. Si un acide aminé Asparagine est présent en position 36, alors cette spore est hautement résistante. Le résidu Asparagine permet une meilleure liaison des protéines à l'ADN. A l'inverse, si un acide aminé Glycine est présent en position 36, alors cette spore sera plus sensible à diverses attaques thermiques et/ou chimiques (110). Il est donc nécessaire que la spore présente un fort taux de petites protéines acido-solubles (1 à 4) afin de résister longtemps dans l'environnement.

Enfin le degré de réticulation des spores affecte la capacité de résistance des spores. Un degré de réticulation élevé rend les spores plus sensibles dans l'environnement (106). Ces propriétés de résistance de la spore sont acquises lors du processus de sporulation. La spore, une fois formée, est particulièrement résistante à tout type de traitement (118).

→La spore elle-même ne peut pas se développer et croître dans l'environnement.

→La forme végétative est la seule forme de développement et de multiplication de *Clostridium perfringens*.

► Il est donc important de rechercher des traitements d'hygiénisation agissant en amont, c'est-à-dire au moment où les populations de *C. perfringens* passent de la forme végétative à la forme de résistance : la spore. On considère que lorsque des traitements peuvent diminuer la concentration en spores, ils peuvent être ainsi jugés particulièrement efficaces sur un grand nombre d'agents pathogènes. C'est pourquoi, dans le but de traiter et de diminuer la concentration en *Clostridium perfringens* au sein d'un environnement, il est important de perturber la sporulation conduisant souvent à la formation de spores très résistantes à de nombreux traitements.

► Lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, la spore repasse sous forme végétative grâce au processus de germination. La germination peut cependant être altérée par des facteurs extérieurs (biologiques, physiques, chimiques) et fragiliser la forme végétative nouvellement créée.

### I.4.3. Traitements appliqués sur les formes sporulantes bactériennes

Comme vu précédemment, les pré-traitements courants d'hygiénisation des intrants de méthanisation n'ont que peu d'effets sur *Clostridium perfringens* et, ce notamment, parce que cette dernière possède la redoutable propriété de pouvoir se protéger *via* le mécanisme de sporulation. Il s'agit alors de trouver un traitement permettant d'atteindre à la fois les formes végétatives et surtout les formes sporulées. Cette partie de l'étude bibliographique a donc pour objectif de faire une synthèse des traitements plus spécifiques et plus actifs sur les spores de cette bactérie.

### I.4.3.1. Traitements physiques

Les effets des différents traitements physiques sur *Clostridium perfringens* reportés dans le tableau 23.

#### Association pression et chaleur

De nombreuses études ont analysé la combinaison de l'effet de la pression et de la chaleur sur la sensibilité des spores bactériennes (119–121). Cette association de traitements agirait de façon synergique (122,123) :

- Une haute pression induirait la germination des spores avec un taux d'acide dipicolinique faible (= sensibilité à la chaleur accrue).
- La chaleur, appliquée de façon simultanée, provoquerait d'importantes altérations de la membrane des spores.

Sur la Figure 19, on peut observer au microscope électronique à transmission, des spores d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* traitées. Le cœur de la spore est vidé de toutes substances et la membrane est fortement endommagée (120). Les spores de *Clostridium botulinum* et *Clostridium sporogenes* sont également sensibles à la combinaison du traitement haute pression-chaleur (119). Toutefois, l'étude de Bull *et al.* (119) souligne la complexité du mécanisme d'action de ces traitements car ces derniers se révèlent être bactéries et milieux-dépendants.

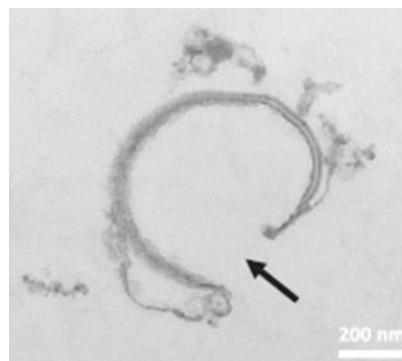


Figure 19. Image d'une spore d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* après un traitement de 600 MPa pendant 5 minutes à 80°C (120).

Des chercheurs (118) se sont focalisés sur l'effet du couplage pression-chaleur sur deux souches de *Clostridium* : *Clostridium sporogenes* et *Clostridium perfringens* type A (souche également utilisée lors de nos expérimentations). La haute pression seule (550 à 650 MPa) n'a aucun effet sur les spores. Une inactivation des spores est observée lorsqu'il y a couplage de la haute pression avec la chaleur. L'étude d'Evelyn *et al.* (124) montre aussi un effet de la combinaison de la pression et de la chaleur (600 MPa, 10 minutes, 73°C) sur l'inactivation de spores de *C. perfringens* dans de la viande de bœuf (Tableau 24). Cette association entraînerait une augmentation de la perméabilité de la membrane interne des spores.

## Association ultrasons et chaleur

Le traitement par ultrasons (1 minute) combiné à un choc thermique (10 minutes à 80°C) permet de réduire rapidement la résistance thermique des spores de *Clostridium perfringens* contenues dans de la viande de bœuf (Tableau 23). L'inactivation des spores par la chaleur est deux fois plus rapide si les ultrasons sont appliqués avant la température (125). Toutefois, le mécanisme d'action de ces traitements sur les spores de *C. perfringens* est, à l'heure actuelle, inconnu.

## Traitement thermique

Lorsque des traitements thermiques sont appliqués à des températures supérieures à 70°C (pasteurisation), il est possible d'obtenir un abattement des spores de *Clostridium perfringens*. Le temps de réduction décimal (= abattement par un facteur 10 de la population bactérienne) est compris entre 1 et 60 minutes pour des températures variant de 90 à 100°C (126). La chaleur seule peut aussi affecter la germination des spores de *C. perfringens*. Un traitement à 90 ou 100°C appliqué à des spores présentes dans une solution tampon PBS pendant 20 minutes entraîne une diminution de plus de 95% de viabilité de ces spores (127) (Tableau 23).

Cette diminution de la viabilité des spores (88) serait due à :

- Un désordre membranaire avec dénaturation des lipides et protéines.
- Des mutations au niveau des acides nucléiques contenus dans la spore.

Certaines études ont été réalisées avec des matrices « complexes » et non en culture pure. Par exemple, un traitement à 110°C durant quelques minutes a permis un abattement de 6 log de la concentration en spores de *Clostridium perfringens* dans du jambon de porc (128) (Tableau 23). Dans cette même étude, le temps de réduction décimale varie de 30,6 à 1,9 minutes pour des températures allant de 90 à 100°C. Pourcher *et al.* (74) ont aussi pu constater qu'une température de 70°C pendant 72 heures permettait un abattement complet de la concentration en spores de *C. perfringens* dans du lisier de porc. Dans cette même étude un autre paramètre que la température entre en ligne de compte : le temps d'exposition.

Tableau 23. Types et effets des traitements physiques sur les spores de *Clostridium perfringens*.

Type de traitement physique	Effets sur les spores	Référence
Haute pression + chaleur	Germination forcée fragilisant <i>Clostridium</i>	(119,122)
	Inactivation des spores	(118,124)
Ultrasons + choc thermique	Inactivation des spores	(125)
Chaleur	Diminution de la viabilité des spores	(127)
	Abattement de la concentration en spores	(74,126,128)

### I.4.3.2. Traitements chimiques

**Certains composés chimiques peuvent aussi altérer la résistance des spores. Ils ont un effet bactéricide ou bactériostatique. La majorité des résultats présentés est issue des données extraites à partir de produits utilisés en hygiénisation agro-alimentaire.**

#### Traitement à partir de molécules extraites à partir de composés naturels

Les traitements des spores de *Clostridium perfringens* peuvent être réalisés à partir de composés naturels extraits de plantes, d'animaux ou de bactéries. Les résultats sont reportés dans le tableau 24.

##### Extraits de plantes

L'aldéhyde cinnamique, extrait de l'essence d'écorce de cannelle, a été utilisé pour diminuer la germination et la reprise de la croissance de *Clostridium perfringens*. Ce composé a entraîné un abattement d'environ 3 log de la concentration bactérienne dans de la viande de bœuf ou de volaille hachés (129,130) (Tableau 24). D'autres huiles essentielles ont également été testées. Un mélange huile d'origan + carvacrol + thymol présente les mêmes effets sur les spores de *C. perfringens* que l'aldéhyde cinnamique (130). Les extraits de thé vert ont également des vertus antimicrobiennes. La teneur en catéchine dans les extraits de thé vert est un élément déterminant de leur pouvoir antimicrobien (131). Un traitement avec un extrait de thé vert contenant une teneur importante en catéchine (697 mg de catéchine par gramme de thé vert) engendre une inhibition plus importante de la germination et de la reprise de la croissance de *C. perfringens* que du thé vert avec un taux de catéchine plus faible (141 mg de catéchine par gramme de thé vert) (131). Ces différents extraits de plantes agiraient au niveau membranaire en dénaturant les protéines.

##### Extrait d'animal

Le chitosane, substance naturelle issue de la chitine extraite de la carapace de crustacés, présente des propriétés hygiénisantes. Cette substance, utilisée comme additif alimentaire pour du bœuf ou de la volaille, permet une diminution de la germination et de la croissance de *C. perfringens* de 4 à 5 log (132) (Tableau 24). Son pouvoir antimicrobien résiderait en sa capacité à entraîner un désordre membranaire et/ou à la possibilité de se lier à des éléments métalliques (fer par exemple) empêchant la croissance bactérienne.

##### Extrait de bactérie

La nisine est une bactériocine, produite par *Lactococcus lactis*. Ses effets sont limités sur *Clostridium perfringens* car cette molécule n'a aucune influence sur la germination des spores. Cependant, ce peptide antibactérien permet de stopper la reprise de la croissance de *C. perfringens* à partir des spores ayant subi la germination (133) (Tableau 24). Elle peut agir de deux façons différentes :

- En formant des pores dans la membrane lipidique (perméabilisation de la membrane)
- En inhibant la synthèse de la paroi cellulaire en se liant à des lipides.

Tableau 24. Traitement à partir de molécules extraites à partir de composés naturels et effets sur les spores de *Clostridium perfringens*.

Type de traitement		Effets sur les spores	Référence
Extrait de plantes	<u>Aldéhyde cinnamique</u>	Inhibition germination	(129)
	<u>huile d'origan + carvacrol + thymol</u>	Inhibition germination	(130)
	<u>Catéchine</u>	Inhibition germination	(131)
Extrait d'animal	<u>Chitosane</u>	Inhibition germination	(132)
Extrait de bactéries	<u>Nisine</u>	Inhibition reprise croissance	(133)

#### Autres composés chimiques

Les résultats des effets de ces autres composés chimiques sur les spores de *Clostridium perfringens* sont reportés dans le tableau 25.

Les nitrites : une inhibition de la germination des spores et de la reprise de la croissance de *C. perfringens* est possible grâce à l'action des nitrites (134) (jusqu'à 4 log d'abattement). Les nitrites sont souvent utilisés dans des aliments destinés à la consommation humaine. Cependant, les chercheurs ont de moins en moins recours à ces derniers car ils peuvent former des dérivés cancérigènes dangereux pour la santé. A l'heure actuelle, dans l'industrie agro-alimentaire, les nitrites sont remplacés par de l'acide sorbique.

L'acide sorbique est un acide organique pouvant inhiber de près de 50% la germination des spores puis la croissance de *C. perfringens* type A dans un milieu simple (99). Dans des matrices complexes telles que de la viande de volaille cuite, cet acide est souvent utilisé en tant qu'agent antifongique et n'a pas d'effet sur *C. perfringens* (99).

L'acide benzoïque est un autre acide organique également utilisé pour diminuer la concentration en agents pathogènes. Cet acide au faible coût et peu toxique présente les mêmes effets que l'acide sorbique sur *C. perfringens* (99).

Ces deux acides (sorbique et benzoïque) pourraient inhiber la germination en bloquant les récepteurs de la germination localisés dans la membrane interne. Ils pourraient aussi interagir en interférant sur le signal de transduction entre ces récepteurs et l'acide dipicolinique.

Un mélange de sels d'acide lactique est une autre alternative aux nitrites. Le lactate de calcium associé au lactate de potassium et au lactate de sodium permettent une inhibition de la germination des spores et de la reprise de la croissance de *C. perfringens* (135) (entre 4 et 6 log d'abattement) (Tableau 25) en chélatant les ions nécessaires à la croissance bactérienne.

Les phosphates présentent un effet sur la sporulation et sur la reprise de la croissance bactérienne après germination (100). Grâce à ce traitement, la sporulation de *C. perfringens* dans du poulet a été inhibée d'environ 5-6 log et la reprise de la croissance après germination de 2-3 log (Tableau 25).

L'acide acétique peut diminuer la concentration bactérienne quelle que soit la matrice agro-alimentaire considérée. Cet agent chimique peut inhiber la germination et la reprise de la croissance dans de la dinde (136) (jusqu'à 5 log d'abattement). Il peut également inhiber cette reprise dans du bœuf (137) (jusqu'à 7 log d'abattement). Cet acide traverserait la membrane plasmique bactérienne sous sa forme non dissociée. Puis, une fois dans le cytoplasme bactérien, il y aurait dissociation : les anions inhiberaient les réactions métaboliques et les protons diminueraient le pH intracellulaire et entraîneraient un stress.

La lacticine, peptide antibactérien produit par *Lactococcus lactis*, est plus efficace sur l'inhibition de la germination des spores et la reprise de la croissance de *C. perfringens* lorsqu'elle est couplée à du citrate ou du lactate de sodium (138). Un abattement de 3 à 4 log est observé avec ce couplage. Les traitements acides potentialisent également les traitements physiques. Lorsque les spores de *Clostridium perfringens* sont baignées dans un milieu contenant de l'acide citrique, l'effet de la haute pression et de la chaleur sur l'inactivation des spores est encore plus significatif (118).

Tableau 25. Types et effets des traitements chimiques sur les spores de *Clostridium perfringens*.

Type de traitement chimique	Effets sur les spores	Référence
<u>Nitrites</u>	Inhibition germination	(134)
<u>Acide sorbique</u>	Inhibition germination	(99)
<u>Acide benzoïque</u>	Inhibition germination	(99)
<u>Mélange de sels lactiques</u>	Inhibition germination	(135)
<u>Phosphates</u>	Inhibition sporulation + inhibition reprise croissance	(100)
<u>Acide acétique</u>	Inhibition germination	(136,137)
<u>Lacticine + citrate ou lactate de sodium</u>	Inhibition germination	(138)
<u>Acide citrique combiné à haute pression + chaleur</u>	Inactivation des spores	(118)

L'étude bibliographique montre que le traitement de *Clostridium perfringens* à partir de molécules extraites à partir de composés naturels induit surtout une inhibition de la germination et non une réelle inactivation des spores.

**Les résultats ont été obtenus, la plupart du temps, dans des cultures pures et non en mélange avec une matrice complexe. Le traitement appliqué a donc une meilleure possibilité d'accessibilité cellulaire. D'autre part, ces études ont été menées, la plupart du temps, en dehors du contexte de la méthanisation. Peu d'auteurs se sont préoccupés des potentiels effets délétères sur la matière organique dans des matrices complexes (c'est-à-dire hors culture pure).**

## I.5. Techniques de caractérisation microbiologique des bactéries sporulantes

Différentes techniques de microbiologie sont disponibles pour la recherche et le dénombrement de micro-organismes indicateurs ainsi que pour la caractérisation d'effets potentiellement bactéricides et/ou sporicides. Cette dernière partie de l'étude bibliographique a pour objectif de présenter ces différentes méthodes en focalisant leur intérêt pour l'étude des formes sporulantes.

### I.5.1. Techniques culturelles classiques

Le principe du dénombrement des micro-organismes sur milieux de culture est fondé sur leur capacité à se multiplier sur un milieu synthétique, dans des conditions nutritionnelles et physiques adaptées. Cette approche de la microbiologie dite « classique », mise au point par Robert Koch (1843-1910), a fondé les bases de nos connaissances actuelles sur la microbiologie.

Les méthodes normées de détection et de quantification des micro-organismes indicateurs sont basées sur des techniques culturelles. Ces techniques, facilement reproductibles, présentent l'intérêt d'être simplement mises en œuvre en raison de leur faible coût (37).

La recherche et le dénombrement des formes végétatives et des spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices sont réalisés après ensemencement sur géloses « Glucose Viande-Foie » (VF) en conditions anaérobies. L'ensemencement en géloses « Tryptone-Sulfite-Néomycine » (TSN) permet une recherche spécifique de *Clostridium perfringens* (139). Salsali *et al.* (66) et Watcha *et al.* (42) ont ainsi pu respectivement caractériser des boues activées et du fumier bovin grâce à ces techniques en milieu gélosé.

Si les **techniques culturelles** restent aujourd'hui les plus répandues, leurs **limites** sont très vite apparues avec l'émergence des techniques moléculaires. Des écarts de concentrations bactériennes importants ont été observés entre le dénombrement des micro-organismes au microscope et par culture. Certaines bactéries présentent une activité métabolique sans avoir la capacité de croître sur milieu gélosé. Cet état de « dormance » caractérise les bactéries viables mais non cultivables (140) et constitue la principale limite aux techniques culturelles classiques (Figure 20).

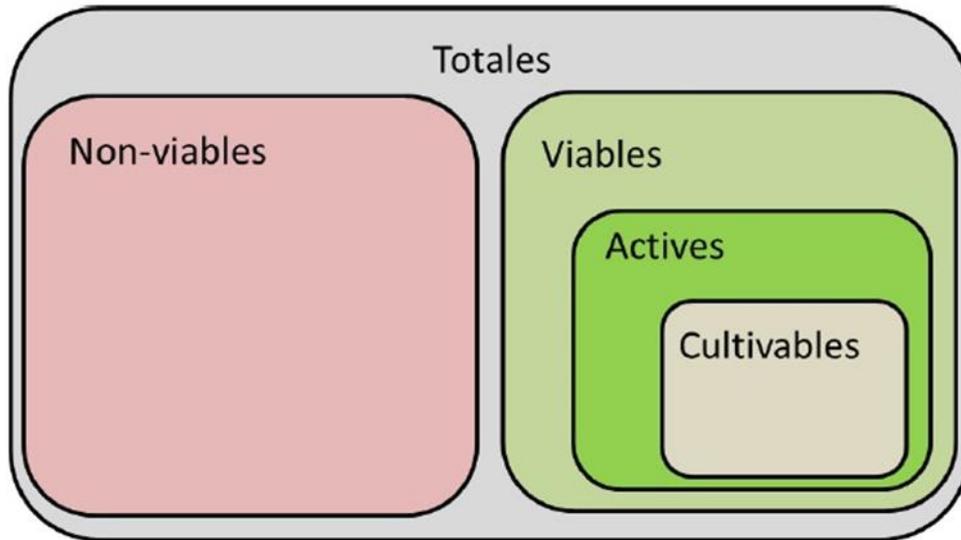


Figure 20. Etats physiologiques bactériens dans l'environnement (141).

### I.5.2. Microscopie électronique

La **microscopie électronique** a toujours joué un rôle essentiel dans le domaine de la microbiologie. Si cet outil n'est pas des plus appropriés pour la recherche et le dénombrement des micro-organismes, son intérêt pour la caractérisation et la compréhension des mécanismes générés par des traitements potentiellement bactéricides est majeur. Il apparaît d'autant plus adapté à la caractérisation d'effets sur les spores bactériennes (142).

Il existe deux types de microscopes électroniques : le microscope électronique à **transmission (MET)** et le microscope électronique à **balayage (MEB)**. Ces deux techniques permettent de visualiser en détail la structure bactérienne. Elles utilisent les électrons au lieu d'employer la lumière afin d'obtenir une meilleure résolution.

Lorsque la **MET** est employée, le faisceau d'électrons est accéléré et traverse l'anode puis traverse l'échantillon à analyser préalablement fixé avec des métaux lourds ou de la résine (143). Les électrons passent à travers une première puis une seconde lentille pour ensuite être projeté sur un écran fluorescent. Les électrons sont ainsi transformés en image. La caméra située sous l'écran va ainsi capturer l'image qui sera retranscrite sur l'ordinateur. Cependant, les images sont obtenues en deux dimensions (115,144) (Figure 21).

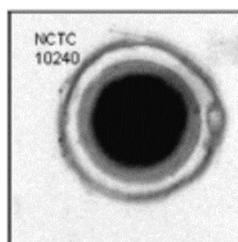


Figure 21. Spore de *Clostridium perfringens* obtenue par microscopie électronique à transmission (115).

Le **MEB** va permettre d'obtenir des images en trois dimensions (145) (Figure 22). Cette technique utilise également les électrons pour reconstituer une image. Il faut que l'échantillon soit recouvert d'un « manteau » de palladium ou d'or (143). Ainsi, les électrons vont réagir avec ce manteau afin de produire des électrons secondaires servant à former l'image. Il existe deux types de détecteurs au sein de ce microscope : le détecteur d'électrons secondaires et le détecteur d'électrons rétrodiffusés. Seul le détecteur d'électrons secondaires est nécessaire pour visualiser la structure des spores bactériennes (143). Ces électrons sont convertis en lumière puis passent dans un photomultiplicateur afin d'être reconstitués en une seule image. Les effets des traitements sur les spores seraient visualisables en trois dimensions (144).

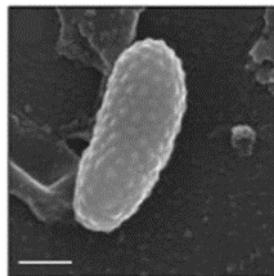


Figure 22. Spore de *Clostridium difficile* obtenue par microscopie électronique à balayage (143).

Ces deux techniques présentent toutefois des inconvénients communs : elles sont opérateur-dépendant, coûteuses et ne permettent pas d'observer les spores vivantes (145). Par ailleurs, l'observation d'échantillons biologiques en MET ou en MEB nécessite une préparation des échantillons contraignante et rigoureuse qui peut être à l'origine de limitations de résolutions si elle n'est pas parfaitement maîtrisée.

### **I.5.3. Analyses directes *via* des marqueurs de l'activité métabolique et de l'intégrité membranaire**

#### **I.5.3.1. Les marqueurs fluorescents**

L'utilisation de sondes fluorescentes employées en combinaison avec des techniques de comptage appropriées permet aujourd'hui une meilleure compréhension des activités métaboliques impliquées dans divers processus biologiques. Un marqueur fluorescent (ou fluorochrome) est une molécule capable d'émettre une fluorescence après excitation par une source lumineuse. De nombreux fluorochromes permettant d'accéder aux différents états physiologiques des micro-organismes sont décrits dans la littérature ; ils conduisent à la détection de paramètres structuraux et/ou fonctionnels (Figure 23).

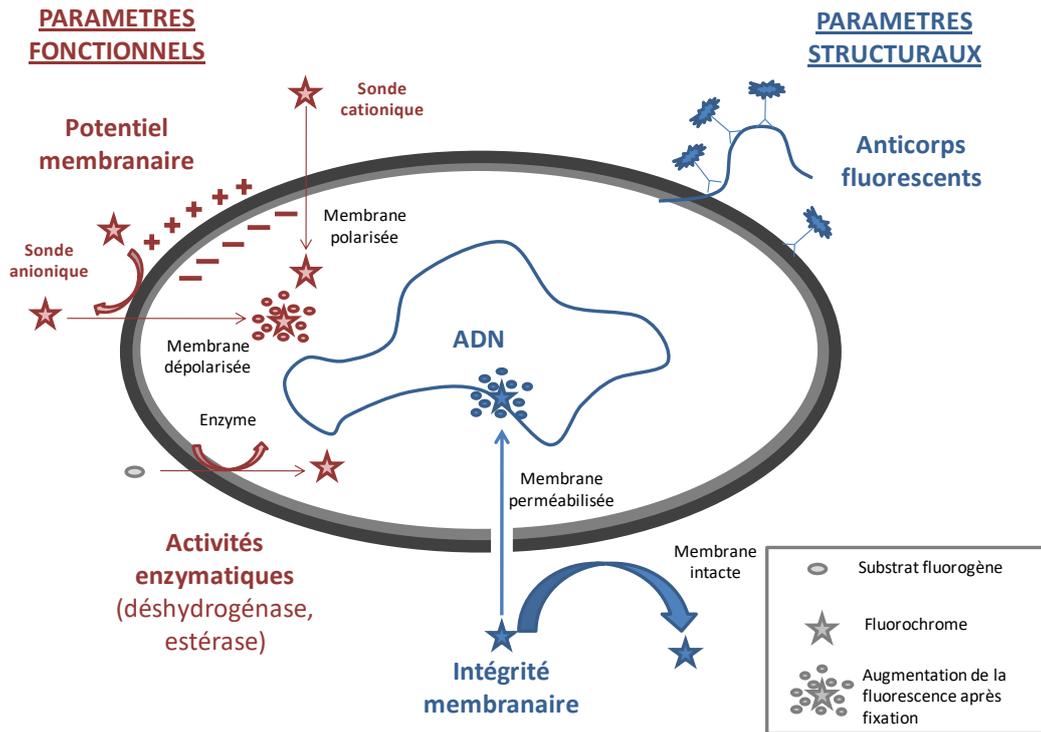


Figure 23. Sites cellulaires cibles des sondes fluorescentes pouvant mettre en évidence des paramètres structurels et/ou fonctionnels dans une bactérie (146).

Différents marqueurs fluorescents peuvent aisément mettre en évidence l'activité métabolique de cellules végétatives. En revanche, la structure des formes sporulées rend impossible la pénétration des substrats fluorescents à l'intérieur de la cellule (147). Cette spécificité complique l'utilisation de marqueurs fluorescents pour mettre en évidence les différents stades physiologiques des formes sporulantes et restreint considérablement le choix des fluorochromes. Le tableau 26 présente les principaux marqueurs fluorescents utilisés en simple ou double marquage décrits dans la littérature.

Tableau 26. Marqueurs fluorescents utilisés sur des bactéries sporulantes.

Souches bactériennes	Fluorochromes	Références bibliographiques
<i>Bacillus licheniformis</i>	Syto16 / PI	(148)
<i>Bacillus subtilis</i>	Syto16 / PI	(149)
<i>Clostridium beijerinckii</i>	CFDA/PI	(150)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	Syto13/PI	(151)
<i>Pseudoclostridium thermosuccinogenes</i>	CFDA/PI	(152)
<i>Clostridium beijerinckii</i>	CFDA/PI Syto9/PI	(147)
<i>Bacillus sp.</i>	CTC-Live/Dead BacLight	(153)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Syto16/PI	(120)
<i>Bacillus cereus</i>	Syto16/PI	(154)
<i>Bacillus cereus</i>	Syto16/PI	(155)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Syto9	(156)
<i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Clostridium tetanomorphum</i>	CFDA/PI	(157)

### I.5.3.2. Visualisation de la fluorescence

Chaque marqueur fluorescent présente une longueur d'onde d'émission et d'absorption spécifique. Différentes méthodes de visualisation sont disponibles :

- La microscopie à épifluorescence ;
- La cytométrie en flux (CMF) ;
- L'imagerie en flux.

La **microscopie en épifluorescence** est une technique performante devenue une méthode de référence pour le comptage de cellules après marquages fluorescents. Elle connaît de multiples applications, que ce soit dans le cadre d'analyse de souches pures ou d'échantillons issus d'écosystèmes complexes (158). L'analyse d'image assistée par ordinateur permet de reconnaître différents paramètres morphométriques (longueur, largeur, surface, périmètre) et de quantifier les cellules. Toutefois, son utilisation est longue et fastidieuse et ne conduit qu'à une vision partielle de l'échantillon.

La visualisation de la fluorescence peut également être effectuée par **cytométrie en flux (CMF)**. Son principe repose sur l'analyse, une à une, de cellules en suspension défilant dans une gaine liquide devant un faisceau laser. Diverses mesures optiques peuvent être réalisées : absorption, réfraction ou fluorescence. Initialement développée pour des applications sur des cellules eucaryotes, les applications de cette technique en microbiologie sont aujourd'hui nombreuses, y compris pour l'étude de formes sporulantes (147,150,157,159). Par cette technique, le niveau d'information apporté sur une population bactérienne, préalablement marquée avec des substrats fluorescents, est considérable. La vitesse d'acquisition, la sensibilité de détection ainsi que l'analyse quantitative multiparamétrique constituent ses principaux avantages. En revanche, l'analyse étant qu'à un unique instant donné, elle ne permet pas d'étude cinétique portant sur une même cellule. Elle ne permet pas non plus de disposer d'images des cellules analysées.

L'**imagerie en flux (IMF)** combine les avantages de la CMF et de l'imagerie photonique, permettant ainsi d'obtenir des données quantitatives de fluorescence et des informations morphologiques sur des cellules en suspension. L'imageur en flux est considéré comme un cytomètre en flux de seconde génération. Il associe la vitesse et la sensibilité de détection des cytomètres en flux actuels à de l'imagerie détaillée et les informations fonctionnelles de la microscopie. Très peu d'applications en microbiologie sont rapportées dans la littérature (160).

**Une partie de ce travail consistait à caractériser les effets d'un traitement acido-thermique d'un point de vue microbiologique :**

- **à l'échelle du procédé, afin d'évaluer le potentiel hygiénisant de ce pré-traitement et ainsi préjuger d'applications potentielles ;**
- **à l'échelle cellulaire, afin d'améliorer les connaissances fondamentales des mécanismes mis en jeu.**

**Le choix de la technique de caractérisation a été effectué en tenant compte du niveau d'information requis. Ainsi, à l'échelle du procédé, une caractérisation microbiologique par techniques culturales classiques a été privilégiée. A l'échelle cellulaire, les effets bactéricides du traitement ont été évalués par CMF. Enfin, un protocole d'analyse de *Clostridium perfringens* par IMF a été développé.**

## BILAN DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude bibliographique a montré que, pour atteindre un effet réellement sporicide sur *Clostridium perfringens* dans des cultures pures ou dans des matrices complexes telles que les intrants de méthaniseurs agricoles (déjections animales notamment), il fallait utiliser des procédés très énergivores, soit seul soit en couplage.

Dans le cadre de notre étude, il est important de rappeler que les traitements appliqués doivent, dans l'idéal, représenter un faible coût énergétique car ils sont utilisés dans le cadre de la méthanisation agricole ayant pour but de produire de l'énergie et non d'en consommer.

Cette étude bibliographique nous a permis de sélectionner certains types de pré-traitements des intrants et d'envisager leur mise en œuvre en tenant compte de l'aspect énergétique et de leurs mécanismes d'action sur les formes sporulées. Ainsi, un traitement thermique de type pasteurisation, un traitement chimique par des AGV (en mélange) et un couplage des deux traitements ont été choisis et mis en œuvre, de manière originale, pour atteindre notre objectif d'hygiénisation des digestats de méthaniseurs agricoles. Tout au long de ce travail, nous avons eu le souci d'évaluer l'efficacité d'hygiénisation et le mode d'action sur les différentes formes de *Clostridium perfringens* via des techniques pointues en collaboration avec la plate-forme BISCEM d'analyse du CBRS à l'Université de Limoges. Mais nous avons aussi eu le souci de vérifier que les traitements hygiénisants n'étaient pas préjudiciables au procédé de méthanisation et, en particulier, au rendement de production de biogaz, faisant de cette étude un travail fortement pluridisciplinaire.

# **Chapitre II. Matériel et méthodes**

Ce chapitre présente la méthodologie mise en œuvre pour étudier un sujet très pluridisciplinaire allant du génie des procédés à l'étude de la cellule. Il s'agit ici d'expliquer les différentes méthodes (et matériels associés) permettant de répondre à la problématique de l'hygiénisation des intrants de la digestion anaérobie agricole avec l'idée sous-jacente d'une hygiénisation concomitante des digestats épandus. La méthanisation agricole est en plein essor en France, et l'épandage des digestats pose de nombreuses questions comme nous l'avons vu dans la bibliographie. Dans cette étude nous nous sommes concentrés sur l'intrant le plus difficile à hygiéniser tant par sa charge en micro-organismes que par la complexité de sa structure : le fumier qui est notre matrice de départ. La méthodologie utilisée est de type « entonnoir » :

- Dans un premier temps, des pré-traitements d'hygiénisation ont été appliqués à du fumier brut (Figure 24). Puis, l'impact du procédé d'hygiénisation sur du fumier brut a été étudié sur différents micro-organismes pathogènes présents dans l'échantillon par des méthodes microbiologiques conventionnelles. Concernant l'hygiénisation, les matériels et méthodes de trois familles de pathogènes sont présentés : les spores de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* et les entérocoques. Enfin, le pré-traitement d'hygiénisation ne doit pas être préjudiciable à la production de biogaz. C'est pourquoi une évaluation des effets des pré-traitements sur le potentiel méthanogène du fumier a été réalisée *via* des tests conventionnels de type BMP et décrits au paragraphe II.1.5.2.
- Dans un second temps, une analyse approfondie de l'effet des pré-traitements d'hygiénisation à l'échelle de la cellule est réalisée. Pour ce faire, les mêmes procédés d'hygiénisation ont été appliqués à une culture pure de *Clostridium perfringens*, espèce *a priori* la plus récalcitrante. Pour le traitement issu de la combinaison AGV / Pasteurisation, l'échantillon a été aussi été chauffé à T<sub>24h</sub> et T<sub>48h</sub> d'incubation avec les AGV. Deux méthodes d'imagerie (la cytométrie en flux et l'imagerie en flux) ont été utilisées pour mener des investigations à l'échelle cellulaire (Figure 25).

Compte tenu de la pluridisciplinarité du sujet, les figures ci-dessous, présentent la méthodologie suivie dans ce travail.

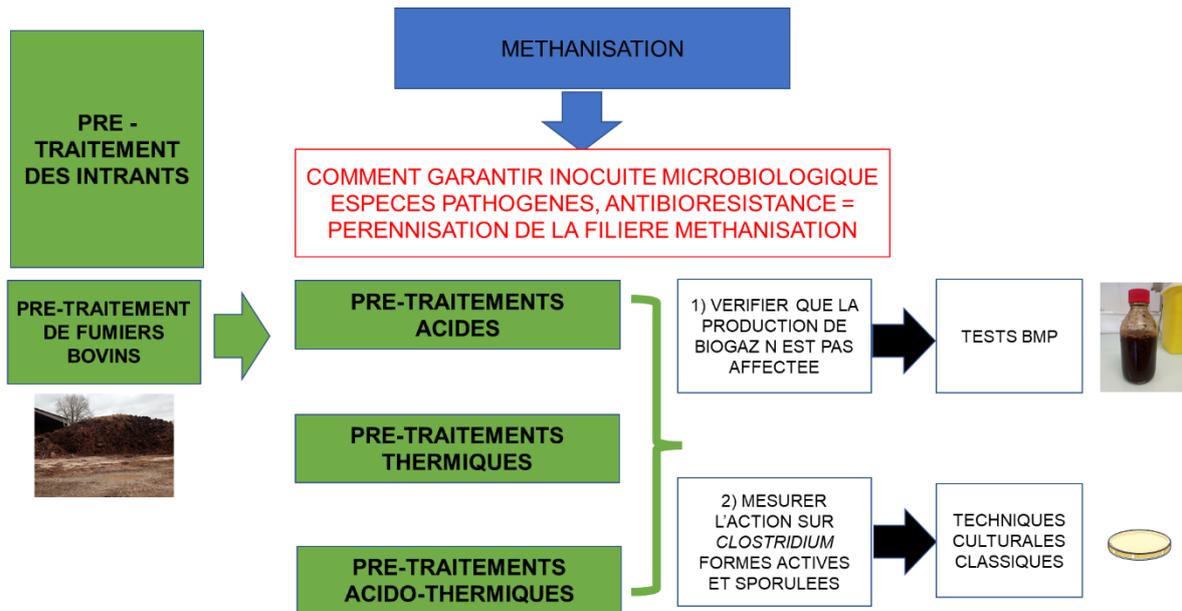


Figure 24. Schéma méthodologique des investigations menées lors des pré-traitements des intrants en conditions réelles sur l'hygiénisation et sur le pouvoir méthanogène.

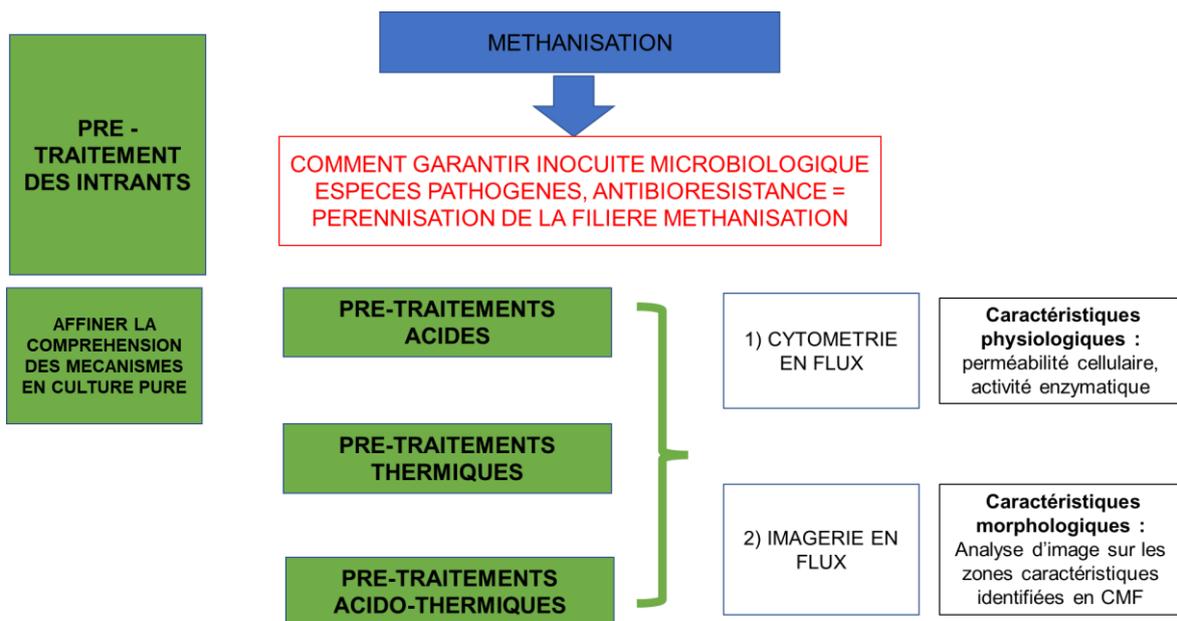


Figure 25. Schéma méthodologique des investigations menées sur la compréhension mécanistique des pré-traitements d'hygiénisation.

## II.1. Caractérisation des effets des pré-traitements à l'échelle du réacteur

### II.1.1. Substrats : origine et préparation de la matrice

La matrice agricole utilisée lors de nos analyses est du fumier bovin (Figure 26). Ce dernier a été prélevé au sein d'une ferme comportant plus de 700 bovins de race limousine près de Limoges (Haute-Vienne, France). Ces déjections bovines ont été choisies pour être prétraitées car elles représentent un des principaux intrants utilisés lors de la digestion anaérobie agricole. Le fumier a été prélevé sur une plate-forme de stockage en ciment. Des prélèvements ont été réalisés de manière verticale et horizontale dans le tas de fumier puis mélangés.



Figure 26. Photographie du tas de fumier prélevé.

Ce fumier a été conservé, après prélèvement, en chambre froide à 4°C au maximum 7 jours afin de limiter une éventuelle activité biologique dans la matrice. La matrice a été caractérisée sur les plans physico-chimique (cf paragraphe II.1.2) et microbiologique avant et après le traitement d'hygiénisation.

### II.1.2. Caractérisation physico-chimique

#### II.1.2.1. Matières Sèches (MS)

Les matières sèches correspondent à la masse de fumier obtenue après un séchage spécifique en étuve suivant la norme NF EN 15934 (161). Pour calculer la teneur en matières sèches, des creusets en porcelaine vides sont pesés (masse a). On pèse ensuite environ 50 g de fumier brut dans le creuset vide (masse b). Le creuset est ensuite placé dans une étuve à 105°C durant une nuit. Il est ensuite placé dans un dessiccateur afin de le refroidir dans une atmosphère dépourvue d'humidité, on pèse de nouveau le creuset, on note cette masse (masse c). Le calcul (Equation 1) ci-dessous permet d'obtenir la teneur en matières sèches exprimée en gramme de matière sèche (gMS) par gramme de matière brute (gMB) :

$$\text{Equation 1 : } (c - a)/(b - a) = x \text{ gMS / gMB}$$

Avec a, b, et c les masses pesées en gramme. Les manipulations sont reproduites en triplicat.

### II.1.2.2. Matières Volatiles (MV)

La méthode utilisée suit la norme NF EN 15935 (162). Les creusets contenant le résidu sec (après séchage à 105°C, masse c) sont placés durant 2 heures dans un four à 550°C (Nabertherm®). Après calcination à 550°C, les creusets sont de nouveau pesés, on notera cette masse d. La teneur en matières volatiles est calculée selon l'Equation 2, elle est exprimée dans cette étude en gramme de matière volatile (gMV) par gramme de matière brute (gMB) :

$$\text{Equation 2 : } (c - d)/(b - a) = x \text{ gMV / gMB}$$

Avec a, b, c et d les masses exprimées en gramme. La manipulation est réalisée en triplicat.

### II.1.2.3. pH

Cette mesure a été choisie parmi d'autres car le pH a une forte influence sur le potentiel de méthanisation qui doit être compris entre 7 et 7,5 afin que la méthanisation puisse être entreprise en laboratoire avec le fumier traité. Le pH des fumiers traités et témoin a été mesuré grâce au pH-mètre Fisher Scientific Accumet AE150®, la précision sur la mesure est de  $\pm 0,01$ . Pour cela, cette mesure a été effectuée sous agitation avec un volume de 10 mL de fumier homogénéisé jusqu'à stabilisation du pH.

### II.1.3. Pré-traitements appliqués au fumier

La préparation de l'échantillon ainsi que l'ensemble des traitements appliqués au fumier bovin sont récapitulés dans le tableau 27 et la figure 27 et effectués en triplicat. Une mesure du pH a été réalisée après chaque pré-traitement afin de s'assurer que le pré-traitement soit compatible avec celui d'une digestion anaérobie.

Préparation de l'échantillon (Figure 27) : 20 g de fumier brut ont été introduits dans des erlenmeyers stériles de 250 mL. 180 mL d'eau stérile ont ensuite été ajoutés puis le mélange a été homogénéisé à l'aide d'une spatule.

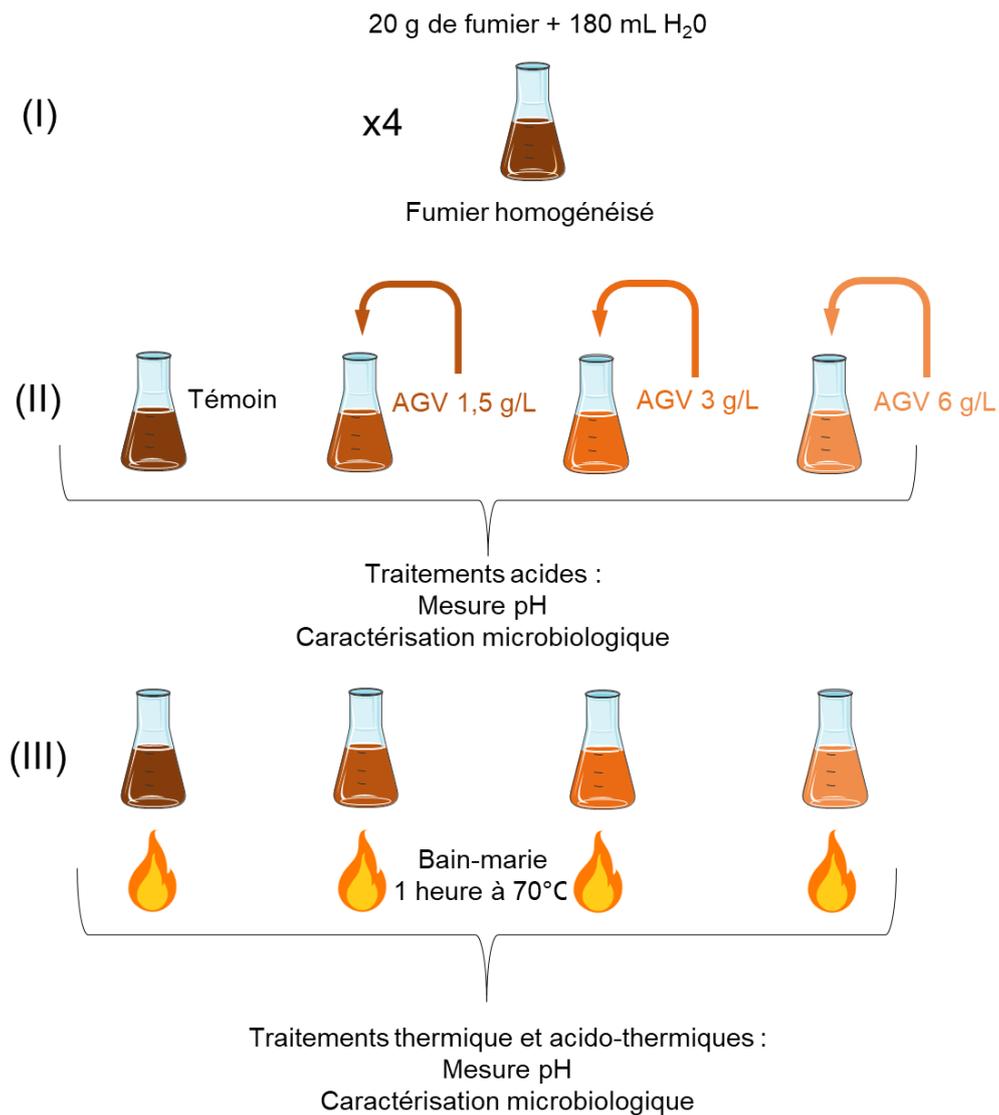


Figure 27. Préparation et traitements appliqués sur le fumier bovin (en triplicat).

Tableau 27. Pré-traitements appliqués sur le fumier

Pré-traitements	Pré-traitements acides	Pré-traitement thermique	Pré-traitements acido-thermiques
	1,5 g/L	1 heure à 70°C	1,5 g/L + 1 heure à 70°C
	3 g/L		3 g/L + 1 heure à 70°C
	6 g/L		6 g/L + 1 heure à 70°C

### II.1.3.1. Traitement du fumier par des acides faibles : les AGV

Le pré-traitement acide a été réalisé avec des acides faibles de type AGV. Un mélange équimolaire d'acides acétique (Carlo Erba®), propionique et butyrique (Acros Organics®) constitue le pré-traitement appliqué à la matrice complexe. Ces acides font partie de la famille des acides gras volatils. Ainsi, les effets sur les bactéries pathogènes peuvent être dus à la fois, à la diminution du pH du milieu mais également aux propriétés chimiques de ces acides qui influent aussi sur leur mode d'action (cf étude bibliographique). Comme indiqué dans la figure 27, des concentrations croissantes en AGV ont été appliquées au fumier brut : 1,5, 3 et 6 g/L. La manipulation est réalisée en triplicat.

Les AGV sont des acides faibles qui peuvent exister sous deux formes :

- la forme moléculaire notée couramment AH ;
- la forme anionique notée A<sup>-</sup>.

Comme évoqué dans la bibliographie, ces acides faibles (Tableau 28) peuvent se retrouver sous forme moléculaire ou sous forme anionique en fonction du pH du milieu et du pKa des AGV utilisés. Lorsque le pH est inférieur à pKa - 1, ils se retrouvent majoritairement sous forme moléculaire. Inversement, lorsque le pH est supérieur à pKa + 1, ils se retrouvent sous forme anionique. Lorsque le pH est compris entre pKa - 1 et pKa + 1, la proportion des formes moléculaire et anionique est du même ordre de grandeur.

Tableau 28. Formule chimique et pKa des acides gras volatils employés lors des expérimentations

Acide Gras Volatil	Formule chimique semi-développée	pKa de l'acide
Acide acétique (ou éthanoïque)	CH <sub>3</sub> -COOH	4,76 à 25°C
Acide propionique (ou propanoïque)	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	4,87 à 25°C
Acide butyrique (ou butanoïque)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	4,81 à 25°C

### II.1.3.2. Traitement thermique du fumier par pasteurisation

Le traitement thermique appliqué correspond à la température de pasteurisation (163) utilisée dans le domaine de l'agro-alimentaire. Pour cela, l'erenmeyer contenant le fumier homogénéisé est plongé dans un bain-marie et maintenu pendant 1 heure à 70°C par contrôle de la température dans l'erenmeyer. La manipulation est réalisée en triplicat.

### II.1.3.3. Traitement acido-thermique du fumier

Le traitement acido-thermique est décrit sur la figure 27, ligne III. Il s'agit de la combinaison du traitement acide (1,5 ou 3 ou 6 g/L) décrit au paragraphe II.1.3.1 et du

traitement thermique (1 heure à 70°C au bain-marie) décrit au paragraphe II.1.3.2. La manipulation est réalisée en triplicat.

#### **II.1.4. Caractérisation microbiologique**

La caractérisation microbiologique des fumiers bovins avant et après traitement a été réalisée en sélectionnant trois micro-organismes « indicateurs » de l'efficacité d'hygiénisation des traitements : les spores de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* et les entérocoques.

##### **II.1.4.1. Dénombrement des spores de *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* est une bactérie au métabolisme respiratoire anaérobie et capable de sporuler lorsqu'elle est soumise à des conditions de stress importantes. Ainsi, la forme sporulée représente la forme résistante de la bactérie et le dénombrement des spores constitue donc une bonne mesure indicatrice de l'efficacité d'un traitement d'hygiénisation.

Le milieu de culture utilisé pour dénombrier spécifiquement *C. perfringens* est le milieu TSN (Tryptone-Sulfite-Néomycine, BK 001HA Biokar Diagnostics®). La néomycine et la polymyxine B, antibiotiques contenus dans ce milieu, permettent un isolement et un dénombrement sélectifs de *C. perfringens*. Les milieux sont préparés dans des tubes à visser contenant 20 mL de milieu TSN.

Afin de quantifier uniquement les spores de *C. perfringens*, un traitement thermique de l'échantillon, préalable au dénombrement, est nécessaire (Figure 28). Lors de nos analyses, 3 mL de la phase soluble du fumier homogénéisé est donc traité thermiquement dans un bain-marie pendant 10 minutes à 80°C suivant la norme NF V08-250 (164). Puis, le tube à essai, ainsi traité, est placé dans un bain de glace. Des dilutions décimales de l'échantillon sont ensuite réalisées dans de l'eau stérile sous un poste de Sécurité Microbiologique (PSM).

De façon simultanée, les tubes contenant 20 mL du milieu TSN sont placés au bain-marie quelques minutes à 90°C afin de liquéfier le milieu et permettre ainsi un ensemencement de 1 mL de chaque dilution décimale par tube TSN. L'ensemencement de chaque dilution décimale est effectué en duplicat et les tubes sont placés 24 heures à l'étuve à 46°C (Figure 28). Des colonies noires vont alors se former dans les tubes. La lecture et le dénombrement ne sont exploitables que lorsque le nombre de colonies par tube est inférieur ou égal à 10.

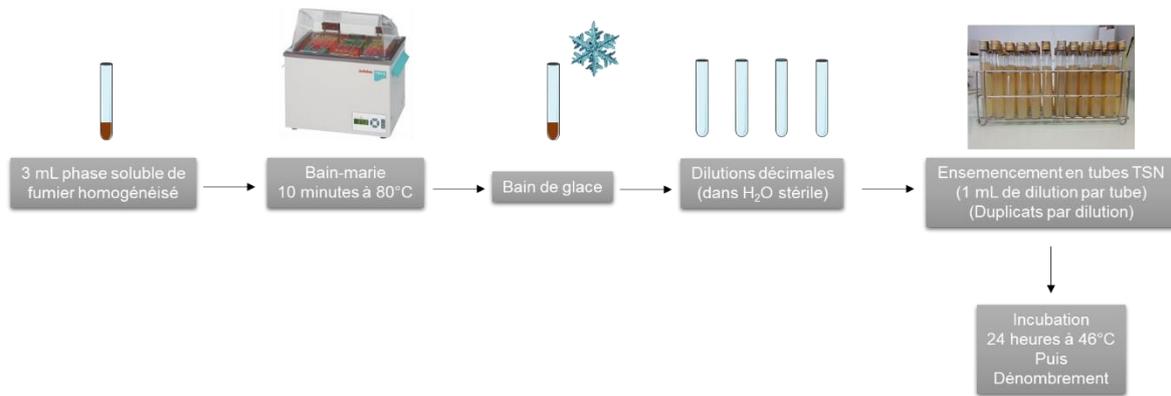


Figure 28. Méthode de dénombrement des spores de *Clostridium perfringens* au sein du fumier bovin.

#### II.1.4.2. Dénombrement des *Escherichia coli*

*Escherichia coli* constitue un indicateur de contamination fécale couramment recherché afin de renseigner sur l'efficacité d'un traitement d'hygiénisation. Des microplaques contenant du milieu MUG (4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide, BT00108, Biokar Diagnostics®) sont utilisées lors des analyses afin de dénombrer *E. coli* dans le fumier traité (Tableau 29).

Ce MUG est présent sous forme déshydratée au fond des puits des microplaques. La recherche de *E. coli*, avec ce dispositif, est basée sur sa capacité à hydrolyser le MUG en 4-méthylumbelliférone et son glucuronide correspondant. *Escherichia coli* possède une enzyme spécifique, la  $\beta$ -D-glucuronidase, capable d'entraîner cette hydrolyse. Cette méthode suit la norme expérimentale CEN/TR 15214-2 (165) qui, elle-même, s'inspire de la norme NF EN ISO 9308-3 (166).

Une première dilution de l'échantillon de fumier homogénéisé est réalisée au dixième avec du sel marin synthétique avec bleu de bromophénol (diluant, BM088, Biokar Diagnostics®) car le fumier est trop épais pour être ensuite prélevés par la pipette multi-canaux (Figure 29). Puis, 18 mL de l'échantillon de fumier dilué au dixième sont incorporés dans des tubes prêt à l'emploi contenant ce sel marin pour obtenir une dilution au 1/20<sup>ème</sup>. Des dilutions décimales sont effectuées dans ce même diluant (Figure 29). Des dilutions allant de 1/20<sup>ème</sup> au 1/2000000<sup>ème</sup> sont ainsi obtenues.

Grâce à une pipette multi-canaux ayant 8 embouts stériles, 200  $\mu$ L sont répartis dans chacun des puits de la microplaque. Ainsi, 6 dilutions successives (16 puits par dilution) peuvent être réalisées dans une seule microplaque. Les microplaques sont ensuite placées dans une étuve à 44°C durant au moins 36 heures et jusqu'à 72 heures (Figure 29). Une lampe UV réglée à une longueur d'onde de 366 nm est utilisée pour compter les puits positifs (fluorescence bleue émise par la 4-méthylumbelliférone). Le dénombrement permet ainsi de déterminer le nombre caractéristique qui permettra ainsi de calculer le NPP (Nombre le Plus Probable) (Equation 3). Ce dénombrement est basé sur la loi de Poisson et l'écart-type est obtenu grâce au programme de calcul initié par Jarvis *et al.* (167) (Equation 4).

### II.1.4.3. Dénombrement des entérocoques

Ces agents pathogènes, indicateurs de contamination fécale, sont dénombrés grâce à l'utilisation de microplaques contenant le milieu MUD sous forme déshydratée (4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucopyranoside, BT00308, Biokar Diagnostics®) (Tableau 29). Le principe est le même que celui décrit précédemment au paragraphe II.1.4.2. Les entérocoques sont capables d'hydrolyser le MUD en 4-méthylumbelliférone et glucose grâce à l'enzyme  $\beta$ -D-glucosidase. Le mode opératoire est identique à celui des microplaques MUG utilisées pour le dénombrement des *Escherichia coli*. Le principe de comptage est également semblable à celui utilisé pour *E. coli*. Toutefois, la norme suivie dans le cadre des entérocoques est la norme NF EN ISO 7899-1 (168).

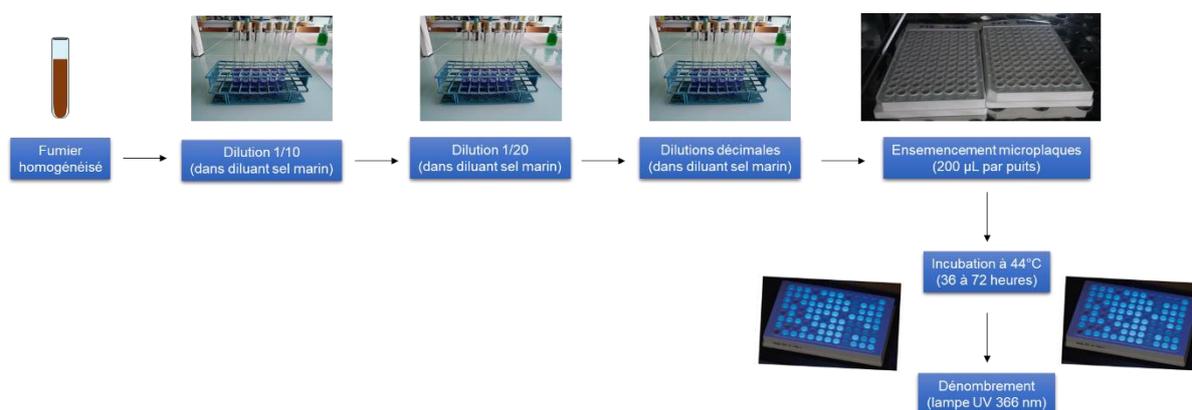


Figure 29. Méthode de dénombrement des *Escherichia coli* et des entérocoques au sein du fumier bovin.

Tableau 29. Milieux et conditions nécessaires pour le dénombrement des agents pathogènes dans du fumier après application des pré-traitements.

Agent pathogène	Milieu de culture	Température et temps d'incubation
Spoires de <i>Clostridium perfringens</i>	Tubes TSN	24 heures à 46°C
<i>Escherichia coli</i>	Microplaques MUG	36 à 72 heures à 44°C
<i>Enterococcus sp.</i>	Microplaques MUD	36 à 72 heures à 44°C

### II.1.5. Evaluation des effets générés par les pré-traitements

#### II.1.5.1. Mesure du potentiel hygiénisant sur la matrice

Concernant le dénombrement des *Escherichia coli* et entérocoques par microplaques, le nombre caractéristique de 3 chiffres, déterminé à partir du nombre de puits positifs par dilution, doit se terminer dans le meilleur des cas par 0 (= absence de puit positif pour la dernière dilution considérée).

A partir de ce nombre caractéristique, le Nombre le Plus Probable (NPP) peut être calculé en résolvant cette équation (Jarvis *et al.* (167)) :

$$\text{Equation 3 : } \sum_{i=1}^k \left[ \frac{x_i d_i w_i}{1 - \exp(-d_i w_i \hat{\mu})} - n_i d_i w_i \right] = 0$$

Avec k, le nombre total de dilutions ; n, le nombre total de puits par dilution ; x, le nombre de puits positifs par dilution ; d, le facteur de dilution ; w, le volume par puits ;  $\hat{\mu}$  la concentration bactérienne.

L'écart-type de ce NPP est calculé selon l'équation suivante (Jarvis *et al.* (167)) :

$$\text{Equation 4 : } \text{Ecart - type NPP} = \log_{10} e \sqrt{\sigma^2 \ln \hat{\mu}}$$

$$\text{avec } \sigma^2 \ln \hat{\mu} = \frac{\text{Var}(\hat{\mu})}{\hat{\mu}^2}$$

Afin de connaître le pouvoir hygiénisant des différents pré-traitements appliqués sur le fumier bovin, une caractérisation microbiologique avant et après traitements a été réalisée. Grâce à ces mesures de concentrations, le pourcentage d'abattement de la concentration en agents pathogènes peut être calculé selon la formule suivante :

$$\text{Equation 5 : } \log(C_i / C_f) \times 100 = \text{0/0 d'abattement}$$

$C_i$  = concentration initiale bactérienne (avant traitement).

$C_f$  = concentration finale bactérienne (après traitement).

## II.1.5.2. Evaluation du potentiel méthanogène des fumiers traités

L'influence des pré-traitements sur le potentiel méthanogène du fumier brut a été évaluée selon la méthode standardisée de la mesure du BMP. Ces tests consistent à reproduire en batch, dans les conditions de température du digesteur industriel, la digestion anaérobie d'un intrant ou d'un mélange d'intrants. L'objectif est de connaître la capacité maximale de méthanisation d'un échantillon, dans des conditions optimales de fonctionnement. Les tests BMP sont réalisés dans un volume constant à partir d'un ratio inoculum/substrat (ou intrant) bien défini pour être dans des conditions optimales et la quantité de biogaz produite est mesurée jusqu'à l'obtention d'une quantité maximale de biogaz. L'inoculum provient en général d'un digesteur industriel traitant déjà le même type d'intrant.

### II.1.5.2.1. Inoculum utilisé

Un inoculum est nécessaire pour mesurer le potentiel méthanogène. L'inoculum, utilisé lors de nos expérimentations, est issu du contenu du digesteur issu de l'unité de méthanisation alimentée en partie par le fumier brut utilisé dans l'étude. Le digesteur opère en mode continu infiniment mélangé, en voie liquide avec séparateur de phase. Les digestats (solide et liquide) sont valorisés en agriculture. Cette unité de méthanisation fonctionne avec un mélange de plusieurs intrants afin de produire du biogaz. Parmi ces intrants, du fumier bovin et des résidus de céréales sont incorporés au méthaniseur. A ces résidus agricoles, s'ajoutent d'autres intrants comme des déchets de cultures fruitières (pommes en l'occurrence). Le méthaniseur produit en moyenne 1400 m<sup>3</sup> de biogaz quotidiennement. Les matières sèches, matières

volatiles et pH de l'inoculum ont été mesurés en laboratoire suivant la méthode énoncée au chapitre précédent. Compte tenu de la texture et de la siccité de l'inoculum, les MS et MV peuvent être mesurées. Le prélèvement de l'inoculum pour les tests BMP a été réalisé en même temps que l'échantillon de fumier, afin d'éviter un stockage trop long pouvant entraîner une dénaturation de la matière.

#### **II.1.5.2.2. Dispositif/Protocole expérimental de réalisation des tests BMP sur le fumier traité**

Des tests de potentiel méthanogène (ou tests BMP) ont été réalisés en laboratoire. Les tests BMP permettent de mesurer la production de méthane associée à la dégradabilité anaérobie de la matière organique (169).

Ces tests permettent de comparer la production de méthane produite par le fumier brut et le fumier prétraité afin d'estimer l'impact du prétraitement sur la production de méthane. Ces derniers ont été réalisés en triplicat pour chaque type de fumier (prétraité ou non). Le ratio inoculum/substrat utilisé lors des analyses, exprimé en grammes de matière volatile, est un ratio 4/1. Plusieurs études ont démontré que ce ratio permet de mesurer le rendement maximal de méthane produit par un substrat agricole (169,170). Ce ratio est optimal pour permettre une production optimale de biogaz par l'intrant de type solide.

Les manipulations sont réalisées dans des flacons Schott® en verre de 1L, fermée avec un bouchon étanche mais permettant un piquage pour le dégazage des fioles. Selon la méthode préconisée par Bachmann *et al.* (169) pour ce type d'échantillons, la concentration en matières volatiles (MV) totale (substrat + inoculum) dans chaque flacon doit atteindre environ 40 g MV/L. Le volume maximal inoculum + substrat par flacon en verre est de 400 mL, ce qui représente 40% du volume total. Ce volume maximal, identique pour l'ensemble des échantillons, permet de laisser un ciel gazeux important de 600 mL pour la production de biogaz.

Lors de nos expérimentations, la concentration en inoculum dans les 400 mL est fixée à 35 g MV/L. A cet inoculum, on ajoute une masse d'échantillon (en g de MV) permettant de respecter le ratio inoculum/substrat de 4/1. Enfin, de l'eau distillée est ajoutée si le volume inoculum + substrat introduit dans le flacon n'est pas égal à 400 mL. Des flacons en verre contenant uniquement de l'inoculum dans les mêmes proportions sont également préparés en triplicat. Ces flacons sont appelés témoins car ils permettent de mesurer la production de biogaz de l'inoculum seul. En retranchant cette quantité à celle des flacons contenant les échantillons on peut obtenir le volume de biogaz produit par l'échantillon (fumier traité ou non) seul. Les tests BMP ont été opérés en conditions thermophiles à 55°C (Figure 30) (température de digestion anaérobie la plus importante) afin d'évaluer le potentiel hygiénisant maximal.

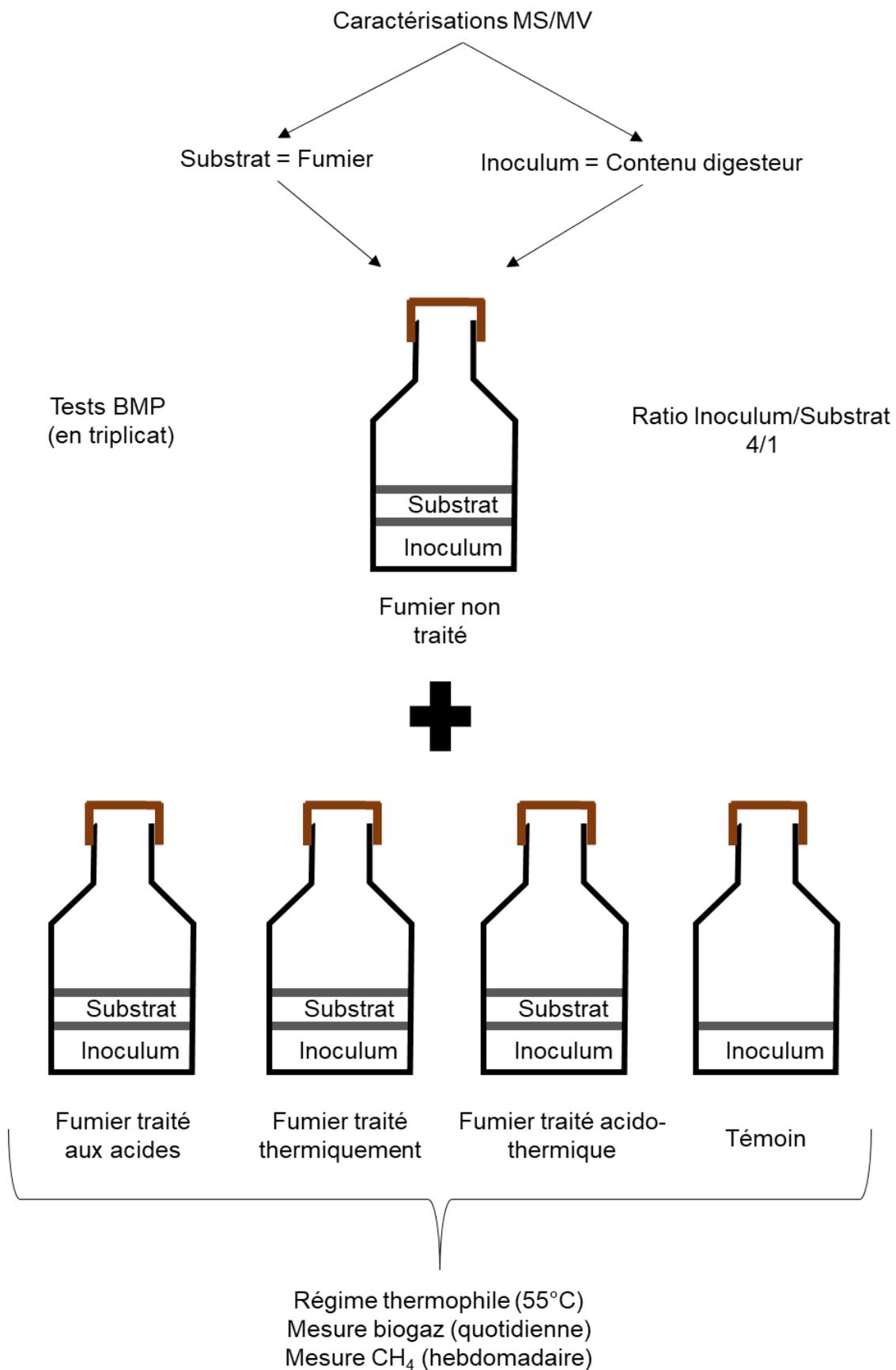


Figure 30. Préparation des tests BMP avec différents fumiers (pré-traités ou non).

### II.1.5.2.3. Mesure de la production de biogaz

Des mesures de la production de biogaz de chaque flacon ont été réalisées quotidiennement grâce à un système de type eudiomètre (Figure 31). Ce système consiste à mesurer la production de biogaz dans le ciel gazeux de l'échantillon, grâce à une éprouvette graduée remplie d'eau à pH 2. L'eau est à pH 2 afin de favoriser la présence du CO<sub>2</sub> (composé du biogaz) et ainsi de ne pas perdre une partie du biogaz produit.

Le septum du bouchon étanche est percé avec une aiguille fine d'un diamètre de 0,8 mm (Braun®) reliée à un tuyau remontant dans l'éprouvette. La production de biogaz (exprimée en mL) peut être mesurée par déplacement du volume d'eau grâce à la libération du mélange gazeux de chaque flacon.

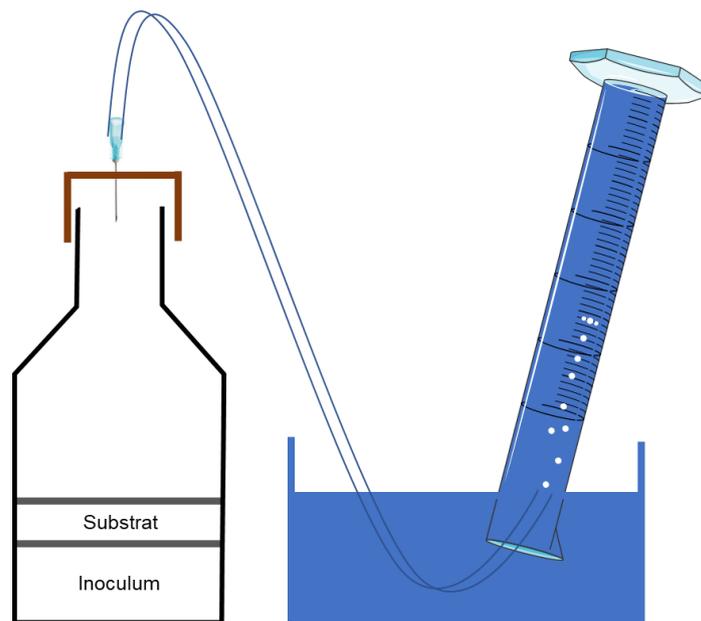


Figure 31. Mesure quotidienne de la production de biogaz par un système de type eudiomètre.

La mesure de la composition de biogaz (méthane et CO<sub>2</sub>) de chaque flacon a été réalisée de façon hebdomadaire par chromatographie en phase gazeuse. L'appareil utilisé est la micro GC 490 Agilent® comportant 2 colonnes : une colonne Molsieve 5A et une colonne PoraPlotU (Agilent®). La première colonne permet la mesure du CH<sub>4</sub> et la seconde mesure la proportion de CO<sub>2</sub>. Le gaz vecteur utilisé pour ces mesures est l'hélium. 10 µL de biogaz sont prélevés par flacon. Afin de connaître le volume de méthane (exprimé en mL de CH<sub>4</sub> par g de MV) produit par chaque flacon, le pourcentage de méthane, mesuré par la micro GC, est appliqué au volume cumulé de biogaz mesuré sur la durée de l'expérience. Le volume total de méthane est connu en répétant cette méthode toutes les semaines jusqu'à la fin de la production de biogaz. Les tests BMP sont considérés comme terminés lorsque la production de biogaz est faible (inférieure à 10 mL par jour).

La production nette de biogaz par le fumier prétraité ou non prétraité a été calculée en la soustrayant à la production endogène des tests BMP d'inoculum seul (Equation 6). Ce même calcul a été appliqué afin de calculer la production nette de méthane par le fumier prétraité ou non prétraité.

Equation 6 :

- a)  $\text{Volume net}_{(\text{biogaz fumier})} (\text{mL}) = \text{Volume biogaz}_{(\text{fumier} + \text{inoculum})} - \text{Volume biogaz}_{(\text{inoculum seul})}$
- b)  $\text{Volume net}_{(\text{méthane fumier})} (\text{mL}) = \text{Volume net}_{(\text{biogaz fumier})} (\text{mL}) \times (\% \text{CH}_4)$
- c)  $\text{Volume net}_{(\text{méthane fumier})} (\text{mL/gMV}) = \text{Volume net}_{(\text{méthane fumier})} (\text{mL}) / \text{Quantité de fumier (gMV)}$

### II.1.5.3. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLStat® (Addinsoft, France). Des tests ANOVA ont été menés afin d'évaluer l'impact des différents traitements sur l'hygiénisation de la matrice ainsi que sur le potentiel méthanogène. Des comparaisons de moyennes de concentrations bactériennes (avant et après traitement) ainsi que des comparaisons de moyennes de production de méthane (avec ou sans traitement) ont pu être analysées statistiquement grâce à des tests de Tukey ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ). Des tests de corrélation de Pearson ont également été utilisés afin d'observer un éventuel effet-dose des traitements acides sur l'abattement de la concentration des différents agents pathogènes.

## II.2. Caractérisation des effets des pré-traitements à l'échelle bactérienne

Dans cette partie, l'objectif est d'analyser plus finement les effets des traitements à l'échelle cellulaire. La matrice de départ, le fumier étant extrêmement complexe de par sa structure et sa composition, il a été nécessaire de travailler en culture pure pour travailler en imagerie.

### II.2.1. Souche bactérienne utilisée et techniques de culture

#### II.2.1.1. Souche bactérienne

Une souche lyophilisée de *Clostridium perfringens* type A (CIP 60.60, Institut Pasteur) est utilisée lors de ces expérimentations (Tableau 30). Ce bacille Gram positif a été sélectionné pour sa capacité à produire des spores (forme de résistance de la bactérie) Cette propriété confère à *Clostridium* la capacité à être une bactérie très difficile à éliminer dans des matrices complexes.

Tableau 30. Caractéristiques de *Clostridium perfringens* (en conditions de laboratoire) (139,171).

<b><u>Forme</u></b>	Bacille
<b><u>Coloration</u></b>	Gram Positif
<b><u>Atmosphère d'incubation</u></b>	Anaérobie stricte
<b><u>Température optimale de dénombrement</u></b>	46°C
<b><u>Température limite de croissance</u></b>	10-52°C
<b><u>pH optimal de croissance</u></b>	6-7
<b><u>pH limite de croissance</u></b>	5-8,3

## II.2.1.2. Milieux de croissance et de sporulation

### II.2.1.2.1. Culture en milieu solide

Le milieu TSN (Tryptone-Sulfite-Néomycine, Biokar Diagnostics®) a été utilisé pour la croissance de la souche sur milieu solide. Le TSN permet l'isolement sélectif et le dénombrement de *Clostridium perfringens* dès 24 heures après incubation sous atmosphère anaérobie à 46°C (Tableau 31). Des jarres et des sachets Gaspak EZ® (Anaerobic system with Indicator, référence 260001, BD®) sont nécessaires pour l'incubation anaérobie des milieux TSN. Un repiquage sur milieu TSN ainsi qu'un renouvellement des sachets entraînant l'anaérobiose sont réalisés toutes les 3 semaines.

### II.2.1.2.2. Culture en milieu liquide

Pour obtenir cette souche bactérienne en milieu liquide et faire croître les formes végétatives, le milieu TSB (Trypto-Caséine Soja, Biokar Diagnostics®) a été utilisé (Tableau 31). Ce milieu bactérien est un milieu nutritif non sélectif permettant la croissance de nombreuses bactéries. Il a été utilisé en tubes à visser avec ajout de paraffine liquide (Sigma-Aldrich®) afin d'entraîner une atmosphère anaérobie nécessaire à la croissance de *Clostridium perfringens*. Ces tubes TSB ont été placés à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

### II.2.1.2.3. Milieu de sporulation

Un milieu de sporulation liquide spécifique à *Clostridium perfringens* a été sélectionné pour effectuer les différentes expérimentations : le milieu DS (Duncan Strong, QB-39-11-56 Nutri-Bact®) (Tableau 31). Ce milieu employé pour l'induction de la sporulation de *Clostridium perfringens* a été utilisé en tubes à visser avec ajout de paraffine liquide pour entraîner une atmosphère anaérobie et placés à l'étuve à 37°C.

Tableau 31. Types de milieux de culture bactériens employés lors des expérimentations sur *Clostridium perfringens*.

<u>Type de milieu de culture bactérien</u>	<u>Nom du milieu de culture</u>	<u>Conditions opératoires</u>
Milieu solide	TSN (Tryptone-Sulfite-Néomycine)	46°C sous atmosphère anaérobie
Milieu liquide de croissance	TSB (Trypto-Caséine Soja)	37°C sous atmosphère anaérobie
Milieu liquide de sporulation	DS (Duncan Strong)	37°C sous atmosphère anaérobie

### II.2.1.3. Culture biphasique

Afin de séparer l'étape de croissance et l'étape de sporulation de *Clostridium perfringens*, une culture biphasique en milieu liquide a été employée (Figure 32). Ce protocole a été adapté à *Clostridium perfringens* à partir des travaux de Abbas *et al.* (172). L'approche consiste à favoriser la production de biomasse dans une première phase (milieu TSB) et, au contraire, de limiter la multiplication des cellules végétatives au profit de la sporulation (milieu DS), dans une seconde phase.

#### Phase 1

Une colonie de *Clostridium perfringens* issue du milieu TSN (culture de 72 heures) est reprise en milieu liquide TSB. La culture est réalisée en erlenmeyers à visser (250 mL) placés dans une étuve à 37°C pendant 24 heures afin que les formes végétatives se développent (Figure 32). L'anaérobiose est assurée par ajout de paraffine liquide.

#### Phase 2

Suite à la phase de multiplication de *Clostridium perfringens* en milieu TSB, la culture est placée en milieu de sporulation (DS). Pour cela, la culture bactérienne est centrifugée à 2000 g durant 15 minutes à température ambiante (centrifugeuse Sigma® 3-16KL). Le culot est ensuite repris dans de l'eau physiologique stérile. Une nouvelle centrifugation pendant 15 minutes à 2000 g est nécessaire. Puis, les culots sont repris dans le milieu DS favorisant la sporulation de *Clostridium perfringens* (Figure 32). Ces milieux, en tubes à essai avec bouchons à visser, sont placés à l'étuve sous atmosphère anaérobie (paraffine liquide) à 37°C pendant 0, 24 ou 48 heures.

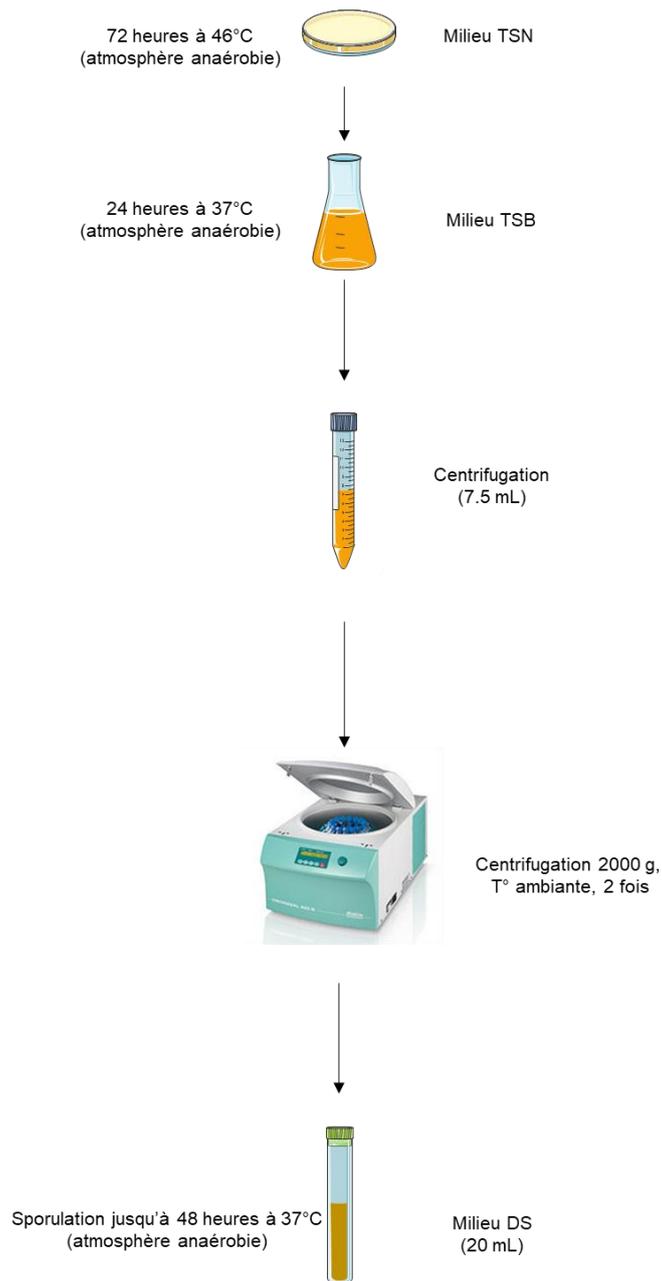


Figure 32. Schéma du protocole d'une culture biphasique de *Clostridium perfringens*.

## II.2.2. Pré-traitements appliqués

A partir de ce milieu Duncan Strong (DS), différents traitements sont appliqués sur cette bactérie. Les différents traitements sont représentés dans le tableau 32 et sur la figure 33.

Tableau 32. Traitements appliqués sur une culture pure de *Clostridium perfringens* en milieu Duncan Strong.

Traitements acides	Traitement thermique	Traitements acido-thermiques
1,5 g/L pendant 0, 24 ou 48 heures	1 heure à 70°C	1,5 g/L pendant 0, 24 ou 48 heures + 1 heure à 70°C
3 g/L pendant 0, 24 ou 48 heures		3 g/L pendant 0, 24 ou 48 heures + 1 heure à 70°C
6 g/L pendant 0, 24 ou 48 heures		6 g/L pendant 0, 24 ou 48 heures + 1 heure à 70°C

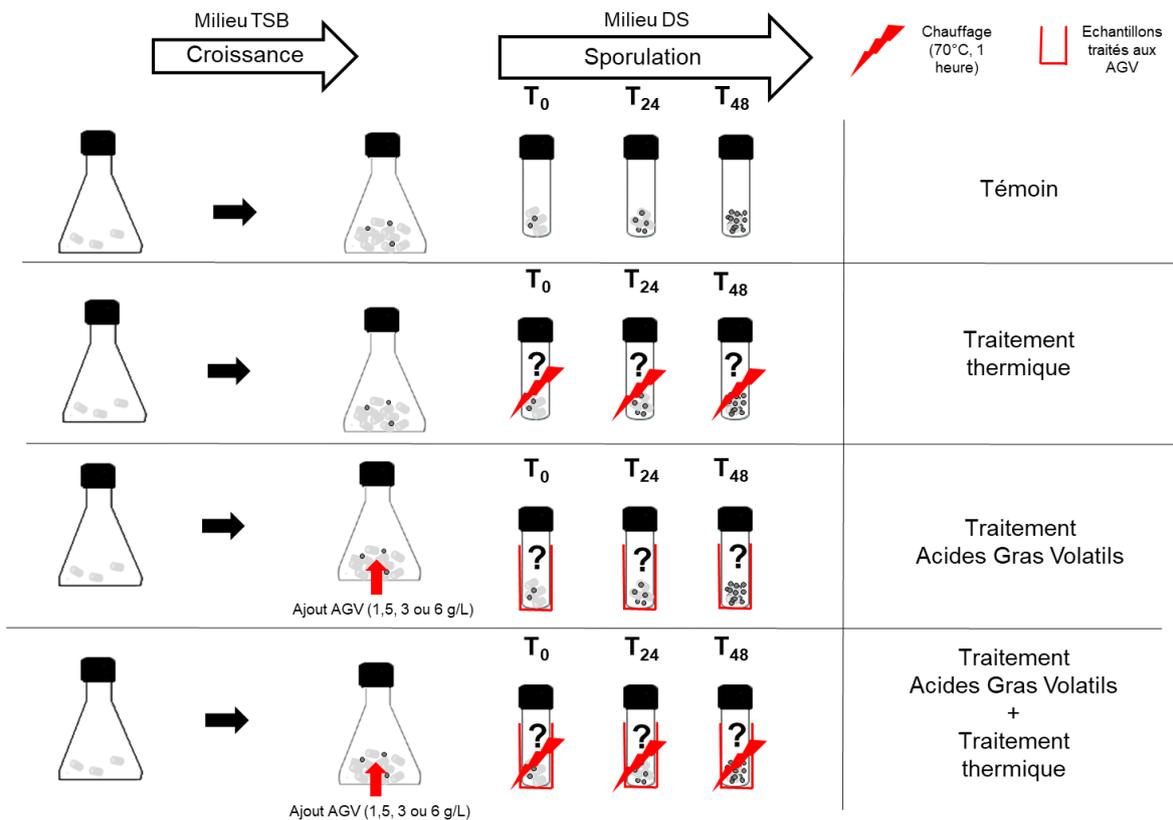


Figure 33. Etape de préparation et application des différents traitements sur *Clostridium perfringens*.

Globalement, les traitements appliqués à la culture pure sont identiques à ceux appliqués au fumier sauf dans les cas du traitement thermique et du traitement acido-thermique, où le traitement thermique a été réitéré à T<sub>24</sub> et T<sub>48</sub>.

### **II.2.2.1. Pré-traitements acides**

Le traitement acide consiste en l'ajout d'un mélange équimolaire d'acides acétique, propionique et butyrique (Acros Organics®) dans la culture de *Clostridium perfringens*. Ces acides font partie de la famille des acides gras volatils. Différentes concentrations ont été appliquées : 1,5, 3 et 6 g/L (66). Ces acides sont directement ajoutés au milieu DS (Figure 33). Deux temps de traitement sont appliqués : 24 ou 48 heures.

### **II.2.2.2. Pré-traitement thermique**

Le traitement thermique appliqué correspond à la température de pasteurisation (163). Après 0, 24 ou 48 heures d'incubation dans le milieu DS, 1,5 mL de cette culture sont prélevés et placés dans des tubes à essai stérile pour être traités thermiquement au bain-marie 1 heure à 70°C (Figure 33). Une fois traités, les échantillons sont placés dans un bain de glace.

### **II.2.2.3. Pré-traitements acido-thermiques**

Le traitement acido-thermique est la combinaison du traitement acide (1,5 ou 3 ou 6 g/L) au traitement thermique (1 heure à 70°C au bain-marie) (Figure 33).

## **II.2.3. Caractérisation des effets générés par les pré-traitements sur une culture pure bactérienne**

La cytométrie en flux et l'imagerie en flux sont les deux méthodes choisies au cours de cette thèse pour caractériser les effets des traitements sur la culture pure de *Clostridium perfringens*.

### **II.2.3.1. Marquages fluorescents**

Un volume de 1,5 mL de culture de *Clostridium perfringens* en milieu favorisant la sporulation (avec ou sans traitement) est prélevé et centrifugé (Eppendorf Mini Spin®) à 3266 g ou 5400 rpm pendant 15 minutes à température ambiante. Les culots sont repris dans un volume de 4 mL de solution tampon de PBS (PBS, 1X, Eurobio Scientific®, Les Ulis, France). La mesure de la densité optique à 600 nm des échantillons est réalisée grâce à un spectrophotomètre (Shimadzu®, UV-1700 PharmaSpec®) et des cuves en plastique (Fisherbrand®) contenant 1 mL d'échantillon. La densité optique doit être égale à  $0,1 \pm 0,05$  pour obtenir une analyse optimale des échantillons par les appareils d'analyse. Les échantillons sont dilués avec du tampon PBS lorsque la densité optique est trop importante.

Puis, des volumes de 2 mL de chaque échantillon à analyser sont placés dans des tubes à hémolyse stérile et conservés à 4°C durant le transport jusqu'à la plateforme de cytométrie (Plateforme technologique de l'Université de Limoges BISCEm, UMS Inserm 42, CNRS 2015).

Un double marquage 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (CFDA), (Invitrogen®) et iodure de propidium (IP), (Invitrogen®) est nécessaire à l'analyse en cytométrie ou imagerie en flux. Ce marquage se révèle être le plus approprié afin de discriminer les formes végétatives actives des spores bactériennes (147). Ce marqueur est perméable et non toxique pour les bactéries. Il s'accumule facilement à l'intérieur des bactéries viables et réagit avec les composés aminés de ces dernières. Le CFDA hydrolysé émet de la fluorescence (Ex(max) : 495 nm ; Em(max) : 519 nm). Par conséquent, le CFDA est utilisé comme marqueur d'activité enzymatique permettant la détection de bactéries viables. Les bactéries, lorsqu'elles sont métaboliquement actives ont la capacité de lyser le CFDA en carboxyfluorescéine, composé fluorescent vert (Figure 34). L'iodure de propidium est un marqueur d'intégrité membranaire. Cet agent imperméant s'intercalant dans le petit sillon de l'ADN. Par conséquent, il pénètre uniquement les bactéries aux membranes altérées (Figure 34). Il est utilisé comme indicateur de mortalité de la bactérie (173).

Après marquage au CFDA à une concentration finale de 22 µM, la suspension bactérienne est incubée à 37°C. Plusieurs temps d'incubation avec le CFDA ont été testés (10, 30 et 60 minutes). Une incubation de 30 minutes a conduit à un marquage optimal, c'est donc le temps d'incubation retenu. Enfin, pour le marquage de l'intégrité membranaire, une concentration finale en IP de 7,5 µM est ajoutée juste avant l'analyse des échantillons par cytométrie ou imagerie en flux.

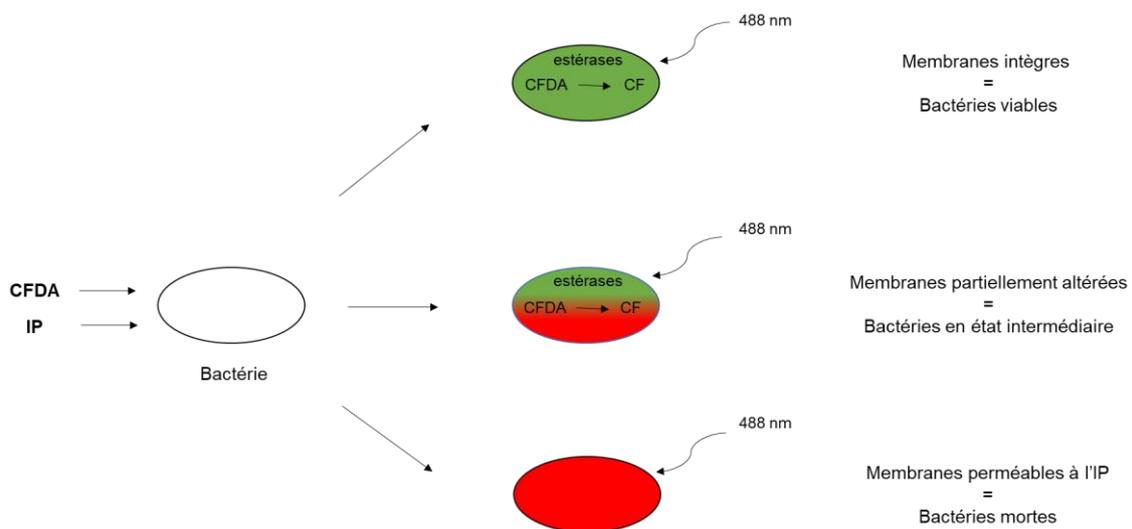


Figure 34. Principe du double marquage CFDA-IP (173).

## II.2.3.2. Caractérisation des effets par cytométrie en flux

### II.2.3.2.1. Définition et principe de la cytométrie en flux

Apparue dans les années 1980 pour détecter des anomalies dans les cellules animales, en particulier du cycle cellulaire, cette méthode est aujourd'hui largement utilisée en microbiologie. La cytométrie en flux ou CMF, dont le principe est fondé sur une analyse de cellules isolées entraînées par un flux liquide, est une technique relativement puissante par sa rapidité (environ 1000 évènements par seconde), sa précision et sa sensibilité d'analyse. Les cellules en suspension défilent, une à une, dans une gaine liquide traversée par un faisceau laser (Figure 35).

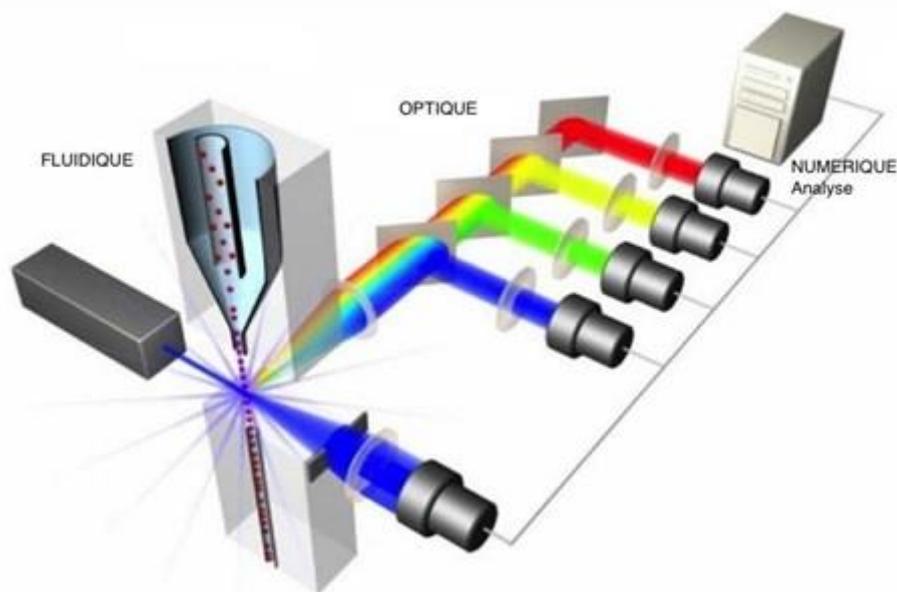


Figure 35. Principe de la cytométrie en flux.

Les cellules émettent alors des informations lumineuses séparées par un réseau optique et dirigées vers des photomultiplicateurs qui les amplifient et les transforment en signaux électroniques. Plusieurs paramètres peuvent être pris en compte simultanément. Il s'agit, d'une part, des paramètres de diffusion de la lumière par les cellules dans l'axe *Forward Scatter* (dispersion à 180°, FSC) ou à angle droit *Side Scatter* (dispersion à 90°, SSC) qui sont fonction des caractéristiques morphologiques de la souche analysée, et d'autre part, de paramètres de fluorescence *via* l'utilisation de fluorochromes spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire. Les signaux lumineux émis par les cellules (fluorescence ou diffusion) sont traités et quantifiés sous forme d'unités arbitraires et proportionnelles à l'activité de la fonction étudiée ou de l'importance du paramètre structural exploré.

### II.2.3.2.2. Caractéristiques techniques et analyse des échantillons

Les analyses sont réalisées à la plateforme technologique de l'Université de Limoges (BISCEM, UMS Inserm 042, CNRS 2015). L'appareil utilisé est le cytomètre Cytoflex LX® (Beckman Coulter®) équipé d'un laser argon (488nm) d'une puissance de 50 mW. 488 nm correspondant à la longueur d'onde d'excitation des fluorochromes utilisés (IP et CFDA). La fluorescence verte, émise par les bactéries qui ont hydrolysé le CFDA est collectée à l'aide d'un filtre passe-bande de 530 ( $\pm$  30) nm. La fluorescence rouge, émise par les bactéries marquées avec l'IP, est recueillie à l'aide d'un filtre passe-haut de 610 ( $\pm$  30) nm. Avant analyse de la fluorescence, une acquisition conditionnelle est réalisée de façon systématique sur un cytogramme FSC/SSC pour éliminer au maximum de l'analyse les débris et agrégats cellulaires. (cytogramme A, Figure 36). Les analyses sont réalisées sur un minimum de 10 000 cellules à la vitesse d'environ 500 cellules par seconde. Le traitement des données est réalisé avec le logiciel Kaluza® (Beckman Coulter®).

La figure 36B représente un cytogramme type obtenu après double-marquage de *Clostridium perfringens* avec le CFDA (Fluorescence verte exprimée en Unités Arbitraires (UA)) et l'IP (Fluorescence rouge, intensité exprimée en UA).

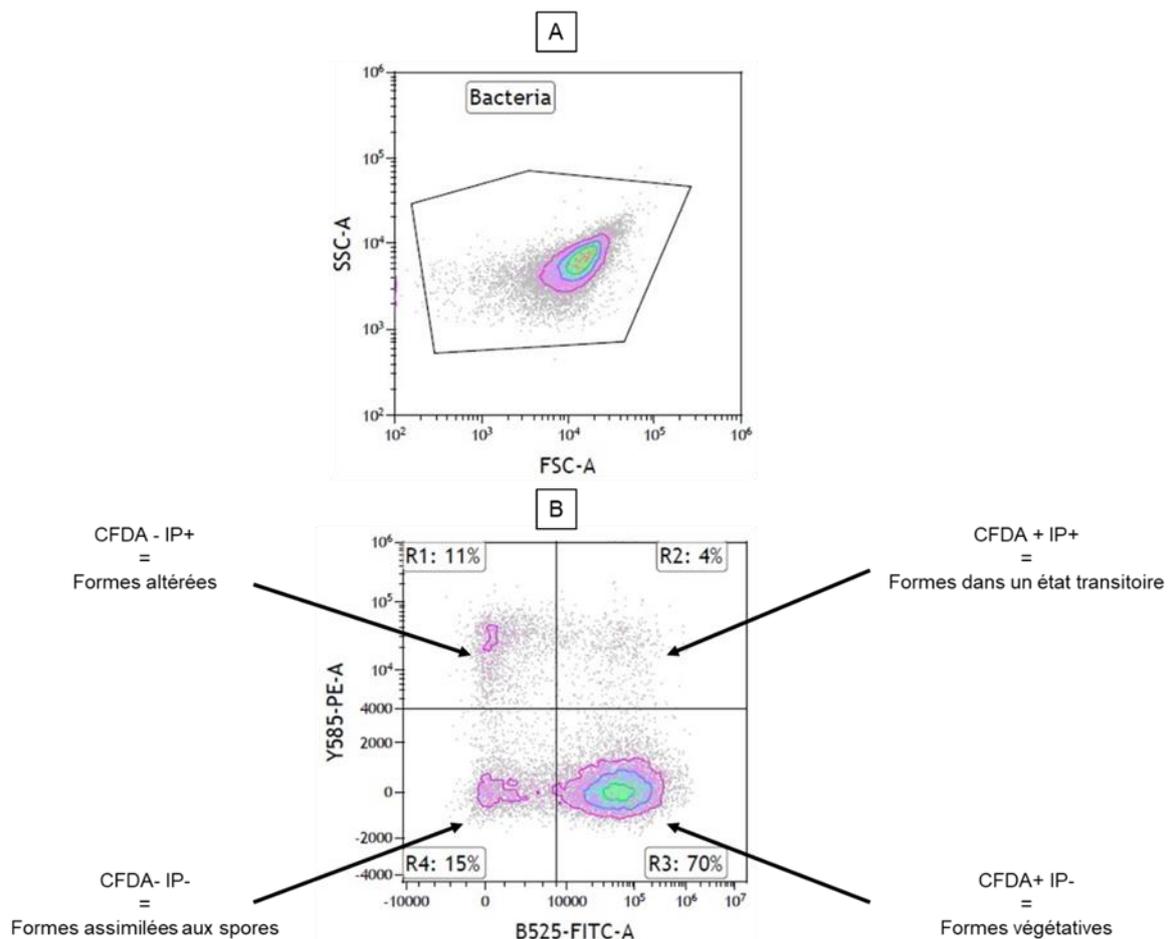


Figure 36. Représentation d'un cytogramme type obtenu après double marquage CFDA/IP d'un échantillon de *Clostridium perfringens*.

### II.2.3.3. Caractérisation des effets par imagerie en flux

#### II.2.3.3.1. Principe général

L'imagerie en flux proposée par *AMNIS Corporation® (ImageStream 100)* combine cytométrie en flux et imagerie photonique, permettant d'obtenir des données quantitatives morphologiques *via* des images en deux dimensions, sur des cellules en suspension. Le principe de cette technique est le même que celui de la cytométrie en flux, à la différence près que des caméras intégrées dans l'appareil prennent des photographies des cellules, permettant ainsi de filmer en temps réel les particules qui passent devant le ou les laser(s). (Figure 37).

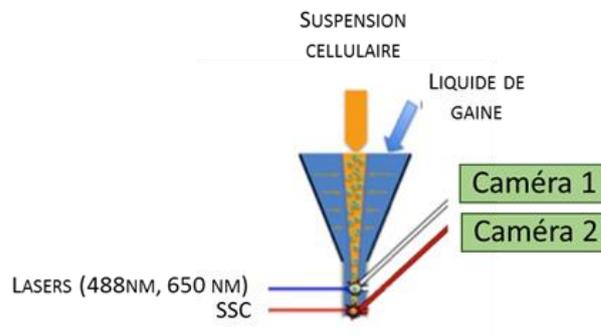


Figure 37. Principe de l'imagerie en flux.

L'échantillon à analyser (cf préparation dans le chapitre II.2.3.1) passe à travers une gaine contenant un liquide d'entraînement et les cellules rencontrent différentes sources lumineuses dont 5 lasers d'excitation différents et une lumière blanche (« brightfield ») au niveau de la chambre d'analyse. Les cellules sont concentrées en flux par focalisation hydrodynamique : le liquide de gaine accélère les bactéries et les aligne pour qu'elles soient analysées une à une. Chaque faisceau lumineux, une fois projeté sur l'échantillon et à travers l'objectif, suit un trajet optique passant par un jeu de filtres et de prismes spectraux permettant de décomposer la lumière (Figure 38).

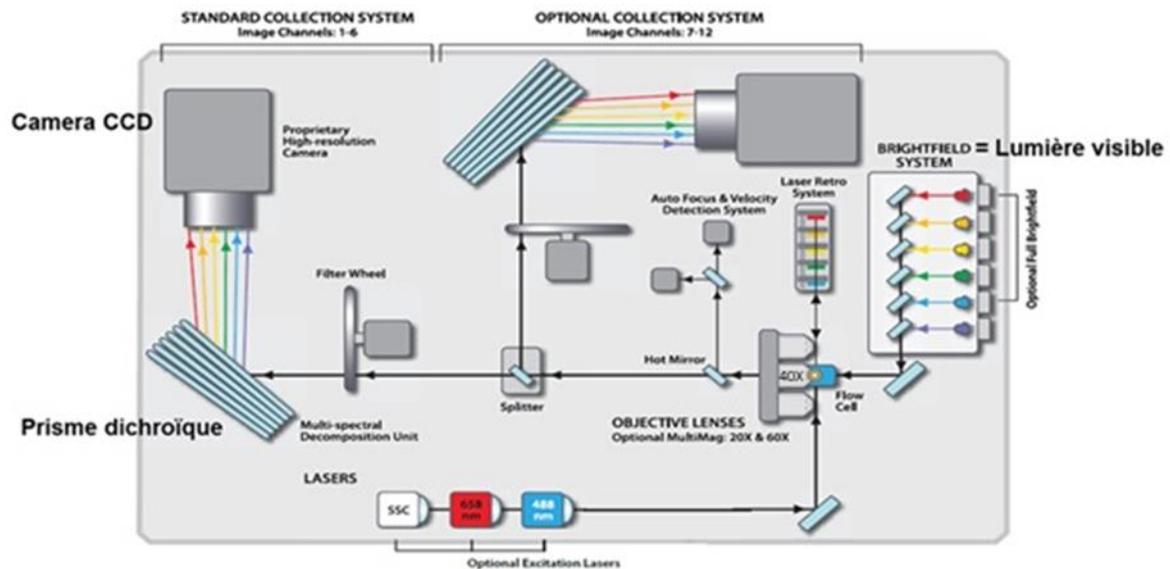


Figure 38. Représentation schématique du système optique de l'imageur en flux : Image Stream X AMNIS® (adapté de <https://www.merckmillipore.com>).

L'ensemble des particules considérées comme des événements sont capturées par deux caméras synchronisées sur la vitesse du flux grâce à des billes de calibration de 1 micron. Chaque image capturée est composée de pixels avec une définition de  $0,5 \mu\text{m}^2$ , un détecteur de vitesse et un autofocus synchronisant les 2 caméras pendant le processus d'acquisition des images. Chaque pixel est analysé en temps réel par un algorithme qui calcule les paramètres morphométriques et photométriques. Les faisceaux lumineux, une fois projetés sur l'échantillon et à travers l'objectif, suivent un trajet optique passant par un jeu de filtres et de prismes spectraux permettant de décomposer la lumière et ainsi d'éviter le chevauchement des différentes longueurs d'onde lors du passage devant les caméras.

### II.2.3.3.2. Caractéristiques techniques et analyse des échantillons

Les analyses sont réalisées à la plateforme technologique de l'Université de Limoges (BISCEm, UMS Inserm 042, CNRS 2015). L'appareil utilisé est l'Imageur en Flux Mark II (Amnis Corporation®, Seattle, USA) (Figure 39). Pour l'étude de *Clostridium perfringens*, l'imageur a été configuré via l'interface d'acquisition du logiciel Inspire (Amnis Corporation®, Seattle, USA) avec les lasers 488, 560 et 785nm. Chaque laser a été réglé respectivement à une intensité de 50 mW, 50 mW et 20 mW. La source de lumière blanche (photodiode) permet d'obtenir des images dans la lumière visible. L'acquisition du nombre d'événements a été réglée à 50 000 cellules par échantillon, dont les images ont été obtenues à un grossissement de x40.

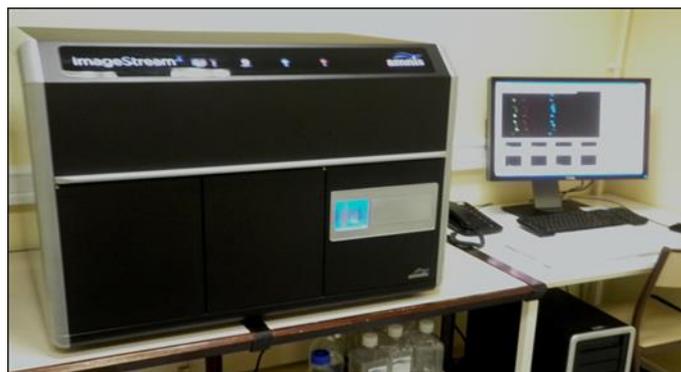


Figure 39. Imageur en Flux ISX (Amnis Corporation®, USA).

Les images saturées ont été éliminées en réglant l'intensité maximale d'acquisition des données à 4000 pixels. L'élimination des déchets a été prévue en collectant uniquement des images pour les événements d'aire supérieure à  $0.25 \mu\text{m}^2$ . De la même manière, la limite supérieure a été fixée à  $1 \mu\text{m}^2$  pour éliminer les amas cellulaires. L'ensemble des cellules considérées comme des événements sont capturés par deux caméras synchronisées sur la vitesse du flux grâce à des billes de calibration ( $1 \mu\text{m}$ , « Speed beads »).

Dans cette étude, les signaux d'intérêt recueillis selon le fluorochrome utilisé dans les différents canaux (Tableau 33) sont :

- Canal 1 : Lumière visible (« Brightfield ») ;
- Canal 2 : CFDA ;
- Canal 4 : IP.

Tableau 33. Canaux d'intérêt de l'imageur en flux dans le cadre de nos expérimentations.

Canal	Image correspondante
Canal 1 : Lumière visible (« Brightfield »)	
Canal 2 : CFDA	
Canal 4 : IP	

### II.2.3.3.3. Analyse des données par le logiciel IDEAS®

Le traitement des données est réalisé avec le logiciel IDEAS® (société Amnis Corporation®). Ce traitement des données a pour objectif d'automatiser l'énumération et la reconnaissance des cellules en fonction de leurs aspects morphologiques et de leur intensité de fluorescence. Cependant, un obstacle majeur apparaît dans l'analyse des données

multiparamétriques. Ce dernier est dû au chevauchement important des spectres d'émission des fluorochromes employés dans notre cas, il s'agit du CFDA et de l'IP. Ce phénomène est bien connu en cytométrie en flux. Il est appelé correction des fuites de fluorescence ou compensation. Afin de répondre à cette problématique, nous avons enregistré de façon séparée les spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés en cytométrie nécessitant l'emploi de compensations électroniques de fluorescence dans l'optique de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence. Le processus de compensation est effectué par le logiciel IDEAS® à partir des données collectées pour chaque échantillon « monomarqué » (CFDA ou IP).

Les informations corrigées relatives à la fluorescence sont représentées sous formes d'histogrammes ou de cytogrammes. L'optimisation de l'analyse et la stratégie de « gating » appliquée à l'étude de *Clostridium perfringens* seront présentées dans les résultats (chapitre III.3).

L'application IDEAS® fournit une galerie d'images pour chaque cellule dans le fichier de données avec les données graphiques. Le logiciel contient des algorithmes puissants qui facilitent et quantifient l'analyse de l'image. Ils permettent de créer deux types de fonctions : le *mask* et la *feature*. Le *mask* se réfère à l'ensemble des pixels qui composent la région d'intérêt. La *feature* est une fonction de calcul. Elle se réfère aux valeurs calculées par IDEAS® à partir des intensités des pixels de l'image.

Lors de ce travail les *feature* : aire, aspect ratio, rapport de forme, longueur, largeur, hauteur, circularité et symétrie ont été investiguées afin de mettre en évidence des différences morphologiques au sein d'une population de *Clostridium perfringens*.

# Chapitre III. Résultats et discussion

### III.1. Application des pré-traitements sur une matrice complexe : impact sur le pouvoir hygiénisant et sur le potentiel méthanogène

#### III.1.1. Objectifs et stratégie

Dans ce chapitre, la problématique de la potentialisation du pouvoir hygiénisant de la méthanisation agricole associée à la conservation du potentiel méthanogène de l'intrant pré-traité a été étudiée. En effet, un pré-traitement très performant sur le plan de l'hygiénisation ne peut pas être appliqué à l'échelle d'un méthaniseur de taille réelle si ce dernier conduit à une réduction drastique du rendement de production de méthane. Au regard des informations issues de l'étude bibliographique et dans un souci de couplage efficacité d'hygiénisation, maintien des performances du procédé et faible coût énergétique, 3 types de pré-traitements ont été appliqués : les pré-traitements acides, thermique et acido-thermiques sont appliqués sur une matrice agricole complexe. Afin d'obtenir des résultats reproductibles, les tests ont été effectués sur l'intrant potentiellement porteur de la plus forte contamination en micro-organismes pathogènes : le fumier bovin. Ce dernier a toujours été prélevé de la même manière (cf chapitre II.1.1), et dans la même ferme, ce qui nous a permis d'obtenir un fumier ayant un taux de paillage et un mode de stockage identique tout au long de ce travail.

Dans ce chapitre, le pouvoir hygiénisant et le potentiel méthanogène des différents pré-traitements sur le fumier ont été étudiés à l'échelle du laboratoire. Concernant l'étude du pouvoir hygiénisant, des indicateurs de contamination fécale *Escherichia coli* et *Enterococcus sp.* ont été dénombrés par techniques culturales classiques avant et après traitement. L'étude bibliographique a bien mis en évidence la nécessité de mesurer l'efficacité des pré-traitements sur les formes sporulées. Les spores de *Clostridium perfringens* ont ainsi été dénombrées dans le fumier bovin avant et après traitement.

Concernant l'étude du potentiel méthanogène, des tests BMP ont été menés en laboratoire dans les conditions décrites au chapitre II.1.5.2 du chapitre matériel et méthodes. Ces tests BMP ont été menés en régime thermophile (55°C) avec une mesure de biogaz quotidienne (par eudiomètre) et une mesure du pourcentage de méthane (par micro GC) hebdomadaire.

Le contenu de ce chapitre a été rédigé sous forme de publication, actuellement en cours de soumission. D'autre part, une partie de ces résultats a été présentée en conférence orale au 8<sup>ème</sup> Congrès International sur la Gestion Durable des Déchets Solides, du 23 au 26 juin 2021 à Thessalonique (Grèce).

**Thermal and acidic pretreatments applied to cow manure: Effects on both pathogenic bacterial persistence and biogas production during thermophilic anaerobic digestion.**

**Thermal and acidic pretreatments applied to cow manure: Effects on both pathogenic bacterial persistence and biogas production during thermophilic anaerobic digestion**

C. Delmon<sup>1</sup>, T. Le Guet<sup>1</sup>, A. Prorot<sup>1</sup>, M. Casellas-Français<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PEIRENE Laboratory, University of Limoges, Limoges, Nouvelle Aquitaine, 87000, France

Corresponding author's address:

Cédric Delmon

Université de Limoges-Laboratoire PEIRENE-Bâtiment C

123 avenue Albert Thomas

87060 Limoges Cedex - France

Corresponding author's email: [cedric.delmon@unilim.fr](mailto:cedric.delmon@unilim.fr) and [magali.casellas@unilim.fr](mailto:magali.casellas@unilim.fr)

Corresponding author's phone number: + 33 5 55 42 36 70

**Abstract**

Anaerobic digestion is a widespread method for producing energy and fertilizer from agricultural waste. However, the digestate may contain highly-resistant pathogens and contaminate agricultural soils. To ensure digestate safety, specific treatment can be applied to farm waste inputs before their incorporation into the digester. The objective of this study is to apply various pretreatments (thermal, acidic or combined acidic and thermal) on farm animal waste (cow manure) in order to evaluate both: 1) the ability of such pretreatments to reduce pathogen survival and content; and 2) the impact of the pretreatments on biogas production (especially methane production). For this purpose, an enumeration of fecal contamination indicators (*Escherichia coli* and *Enterococcus sp.*) and spore-forming bacteria (*Clostridium perfringens*) was performed before and after the pretreatments. In parallel, the impact of these pretreatments on biogas production during anaerobic digestion under thermophilic conditions was assessed thanks to Biochemical Methane Potential (BMP) tests. Results demonstrated that pretreatments lead to a decrease in the primary studied pathogens, except for the spores of *C. perfringens*. As regards biogas production, combined acidic-thermal pretreatments at high concentrations may inhibit methane production.

**Highlights:**

Some pathogens remain in the digestate after agricultural anaerobic digestion.

Pretreatments could enhance the hygienic properties of anaerobic digestion.

Fecal contamination indicators declined thanks to these pretreatments.

*Clostridium perfringens* spores are resistant to these pretreatments.

Pretreatments applied to cow manure could inhibit the production of biogas.

Keywords: Anaerobic digestion, pathogens, pretreatments, hygienization, methane production

1

## Introduction

Over the past few decades, anaerobic digestion has gained considerable popularity in support of the ecological transition. Large quantities of waste (e.g. domestic, agricultural) (Bouaouine et al., 2020; Nazari et al., 2017) can now be used to feed anaerobic digesters; moreover, biogas (especially methane) and fertilizer (digestate) outputs are recovered from this process (Passos et al., 2017). Indeed, the biogas produced during the anaerobic digestion of organic waste yields a sustainable energy potentially used for electricity generation or residential heating. The digestate, which is the solid-liquid residue of anaerobic digestion, can serve as fertilizer to be spread on agricultural land (Liu et al., 2021). The anaerobic digestion process is carried out under various operating conditions, depending on the temperature applied to the digester: psychrophilic (under 30°C), mesophilic (from 30° to 38°C), and thermophilic (from 50° to 55°C) (Scaglia et al., 2014), as well as on the dryness of the mixture (dry vs. liquid digestion) (Seruga et al., 2020). In general, increasing the anaerobic digestion temperature enhances hygienization and reduces pathogen survival (Orzi et al., 2015). However, the digestate may still contain pathogens, such as the microorganisms responsible for human and animal diseases (Scaglia et al., 2014; Seruga et al., 2020). Consequently, obtaining a "safe" digestate, i.e. a digestate devoid of all pathogenic bacteria (either in their active or sporulating form), is key to sustaining and securing the pathway of spreading digestate (Liu et al., 2019). Agricultural waste, like slurry or manure, is known for its pathogenic microorganism content (Li et al., 2021; Pourcher et al., 2009). Protozoan parasites and bacteria can indeed survive in manure. Previous analyses have detected *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum*, two parasites capable of surviving in both manure and surface water for long periods of time (Kumar et al., 2013). Bacteria such as *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* were found in the agricultural waste studied herein. The pathogenic transmission from manure to water or food sources can cause major human or animal health risks. Furthermore, the presence of highly-resistant bacteria (*Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*) in the various inputs is especially worrisome (Bauza-Kaszewska et al., 2014; Li et al., 2012). To ensure digestate safety, a specific treatment can be applied to farm waste inputs before their incorporation into the digester (European Union, 2011). European Union regulations do in fact recommend treating animal byproducts (ABP) before performing anaerobic digestion. This pretreatment is pasteurization, i.e. a thermal process where ABP are treated by one hour of heating at 70°C. Pasteurization produces satisfactory effects on the decrease in *Escherichia coli* concentration yet remains insufficient to effectively remove sporulating bacteria (*Clostridium perfringens*) in cow manure (Watcharasukarn et al., 2009). A higher temperature could be applied in order to enhance digestate hygienization. However, increasing the temperature leads to higher financial and ecological costs. It is worth noting that anaerobic digestion is an ecological process intended to obtain a "green" and renewable energy. Both energy demand and pretreatment costs should remain as low as possible (Tommasi et al., 2008; Valenzuela-Martinez et al., 2010). Alternatives to thermal pretreatments have been investigated, including physical, mechanical, biological, chemical pretreatments etc. (Khanh Nguyen et al., 2021; Li et al., 2012; Orzi et al., 2015; Salsabil et al., 2009). (Kuglarz et al., 2013) found a 50% reduction in the *C. perfringens* content of waste activated sludge after microwave irradiation at 70°C. Furthermore, (Lopes et al., 2020) applied an alkaline treatment to waste activated sludge that served to completely remove *Salmonella sp.* and fecal coliforms after two hours. Acidic treatments are also described in the literature. (Luukkonen et al., 2015) reported a decrease in the *Enterococci* concentration (up to 3-log) by applying peracids (1.5 mg/L) to the wastewater sample. (Tommasi et al., 2008) and (Valenzuela-Martinez et al., 2010) observed positive effects on the decrease in *Clostridium*

*perfringens* concentration after acidic treatments (hydrochloric acid or acetic acid). Various samples were tested; sewage sludge was sampled by Tommasi *et al.*, while turkey roast was selected for analysis by Valenzuela *et al.* Combinations of different types of pretreatments (chemical + thermal) have also been studied; such combinations positively influence pathogen removal efficiency. A combination of temperature and Volatile Fatty Acids (VFA) led to a decrease in pathogen levels, e.g. *Clostridium perfringens* (Salsali *et al.*, 2008), *Salmonella sp.* (Salsali *et al.*, 2006) and *Escherichia coli* (Shin *et al.*, 2006). A combination of heating at 55°C with an acidic mixture (equimolar mixture of acetic, propionic and butyric acids) at 6 g/L triggered a decrease of *Clostridium* concentration in wastewater sludge (Salsali *et al.*, 2008). Furthermore, *Salmonella sp.* concentration was severely reduced by an acidic-thermal treatment, consisting of: acidic mixture at 6 g/L + heating at 49°C for 10 hours (Salsali *et al.*, 2006). VFA treatments are considered to be inexpensive; they destroy bacteria by means of forcing them to use their energy to stabilize intracellular pH (Mani-López *et al.*, 2012). A 5-log reduction was observed on *Escherichia coli* concentration in asparagus puree when applying acetic acid combined with heating (60°C) (Shin *et al.*, 2006). However, the literature describing the consequences of such pretreatment on biogas production is quite scarce (Devlin *et al.*, 2011), and this investigation remains far from completion. The objective of the present work is to apply various pretreatments (thermal, acidic or combined acidic and thermal) to farm animal waste (cow manure) in order to evaluate both: 1) the ability of the given pretreatment to reduce pathogen survival and content; and 2) the impact of such pretreatments on biogas production (especially methane production). Keep in mind that anaerobic digestion is carried out under thermophilic conditions and solid-liquid conditions.

## Materials and Methods

### Raw material origin and pretreatments applied

To assess these pretreatment effects on farm inputs, cow manure was sampled from the agricultural institute specialized in the Limousin cattle breed, where a national testing station has assembled more than 700 cows (Limoges, France). The three pretreatments applied to cow manure are reported in Table 1, namely: 1) acidic pretreatment with VFA, 2) thermal pretreatment, and 3) acidic-thermal pretreatments. The acidic pretreatment consisted of adding an equimolar mixture of acetic (Carlo Erba®), propionic (Acros Organics®) and butyric acids (Acros Organics®) at increasing concentrations of 1.5, 3 and 6 g/L. The thermal pretreatment lasted 1 hour in a water bath at 70°C. The acidic-thermal pretreatments featured a combination of both acidic and thermal pretreatments. Heavy agitation was applied when the acid was added to ensure its ability to be incorporated into the matrix core.

Table 1: Acidic (VFA equimolar mixture), thermal and acidic-thermal pretreatment conditions applied to cow manure

	Acidic pretreatments	Thermal pretreatment	Acidic-thermal pretreatments
Pretreatments	1.5 g/L		1.5 g/L + 1 hour at 70°C
	3 g/L	1 hour at 70°C	3 g/L + 1 hour at 70°C
	6 g/L		6 g/L + 1 hour at 70°C

### Bacterial culture and enumeration

The effects of the various pretreatments on pathogen survival were evaluated on 3 microorganisms (Table 2). *Clostridium perfringens* were chosen because of their occurrence and resistance to high temperature conditions, along with two bacteria known to be good

indicators of fecal contamination (*Escherichia coli* and *Enterococcus sp.*). The experiments were conducted in triplicate. All these bacteria are naturally found in cow manure.

The enumeration of *C. perfringens* was performed by suspending 10 g of cow manure into 90 mL of sterile water. To enumerate *C. perfringens* spores, a ten-fold dilution series was prepared. Each dilution was placed in a water bath at 80°C for 10 minutes. 1 mL of each dilution was then inoculated into a TSN (Tryptone-Sulphite-Neomycin, Biokar Diagnostics®) tube in duplicate and incubated at 46°C during 24 hours.

*E. coli* were enumerated using 96-well microplates. 200 µl of several decimal dilutions of sample were added in each of the 96 wells of the microplate (Biokar Diagnostics®) containing the substrate 4-methylumbelliferyl-b-d-glucuronide (MUG) in dehydrated form. The microplates were incubated under aerobic conditions for 36 hours at 44°C. The hydrolysis of MUG by the β-d-glucuronidase (a specific enzyme to *E. coli*) releases the fluorescent compound methylumbelliferone (MUF), which can then be detected under UV light.

MUD (4-methylumbelliferil-β-D-glucoside, Biokar Diagnostics®) microplates were used to detect *Enterococci*. This method is similar to that used with *Escherichia coli*. These microplates were also incubated under aerobic conditions for 36 hours at 44°C. The microplates used to enumerate *Enterococci* contained the substrate 4-methylumbelliferil-β-D-glucoside (MUD) in dehydrated form. A specific reaction occurred between the *Enterococci* enzyme (β-D-glucosidase) and the MUD substrate; this reaction could be detected under UV light.

The number of positive wells (fluorescent under UV light) after incubation allows for the abundance of *E. coli* or *Enterococci* to be calculated according to a statistical analysis based on Poisson's Law and the MPN calculation program (Jarvis et al., 2010).

Table 2: Pathogen bacteria enumeration after pretreatments applied to cow manure

Pathogen	Medium	Temperature and incubation time
<i>Escherichia coli</i>	MUG microplates	36 hours at 44°C
<i>Enterococcus sp.</i>	MUD microplates	36 hours at 44°C
<i>Clostridium perfringens</i> spores	TSN tubes	24 hours at 46°C

#### Assessment of the biochemical methane potential (BMP) production

To evaluate the influence of pretreatments on biogas production, BMP tests were conducted to study the various pretreatment conditions. The inoculum used for Biochemical Methane Potential (BMP) tests was sampled from an agricultural anaerobic digester near Limoges (France) digesting more than 7,000 tons of inputs per year, with an annual methane production of 169,000 m<sup>3</sup>. Characterization of the starting biomass and inoculum employed was conducted by measuring total solids and volatile solids by standard methods (Bridgewater et al., 2017). The pretreated cow manure samples were introduced into 1-L glass bottles and BMP tests were carried out in triplicate for each treatment. According to (Bachmann et al., 2011), BMP operating conditions consisted of mixing a pretreated manure sample with inoculum in bottles at an inoculum-to-substrate ratio of 4 on a mass Volatile Solids (VS) basis. Untreated cow manure was used as the control, and inoculum alone was used as the blank. The blank allowed determining the proper methane production of the inoculum; this production was then subtracted from total biogas production. The results reported are uniquely representative of substrate biogas production. The pH measurement was settled for each bottle but was always around pH 7 or 8 due to the inoculum mass introduced in excess in BMP

tests and the weak acid volume added (cf. raw materials and pretreatments applied). Thus, acidic treatments did not impact the BMP start and no buffer was necessary for this experiment. The bottles were 40% filled and sealed to preserve anaerobic conditions. The BMP test bottles were incubated at 55°C (thermophilic conditions) until completion of biogas production, which was measured on a daily basis. Methane concentration in the biogas was measured daily by means of a gas chromatograph (Agilent Micro GC 490®). Total average methane production (in triplicates) was reported in terms of cumulative production over time.

#### Statistical analysis

All statistical tests were performed using XLStat software 197 (Addinsoft, France). Anova tests were carried out for bacteria enumeration and total methane production BMP tests comparison. The means were compared by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). Supplementary statistical tests concerning bacterial analysis were performed with Pearson correlation test ( $p \leq 0.05$ ).

### **Results and Discussion**

#### **Effect of pretreatments on pathogen persistence**

##### Acidic pretreatments

The concentrations of *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.* and *Clostridium perfringens* spores after acidic pretreatments are presented in Figure 1. The acidic pretreatment consisted of adding cow manure to 1.5, 3 and 6 g/L of a mixture of VFA described above in the "Materials and Methods" section. The raw cow manure sample (without acidic pretreatment) was used as a control; in this sample, the *Escherichia coli* concentration equaled approx. 4.4 log CFU/g of Raw Matter (RM). Next, this *E. coli* concentration was reported for increasing acidic pretreatment concentrations ranging from 1.5 to 6 g/L. Regardless of the acidic concentration added to the raw cow manure, the *E. coli* concentration remained similar to the control (4.4 log CFU/g of RM) with a very low standard deviation, thus corroborating measurement reliability. In our study therefore, acidic pretreatment had no influence whatsoever on the persistence of *E. coli*. This result is debatable in mechanistic terms since other research has found a 3-log reduction in *E. coli* concentration with acidic treatments (Devlin et al., 2011). The difference in sample origin (waste activated sludge) and type of acidic pretreatment (hydrochloric acid) could explain these differences. First, cow manure is different from sludge in terms of both its structure and composition, thus creating an accessibility hindrance (i.e. jumbled bacteria in the matrix) and causing organic matter degradation by acids. Second, hydrochloric acid is a strong acid compared to VFA, hence explaining a stronger impact on the cellular structure.

As regards *Enterococcus sp.*, the raw cow manure contained 5.4 log CFU/g of RM. *Enterococcus sp.* concentrations in two treated cow manure samples (1.5 and 3 g/L of acids) were similar to those in raw cow manure (respectively 5.3 log and 5.2 log). However, a significant 1-log reduction in *Enterococcus sp.* occurred when the cow manure was treated with acids at 6 g/L (Fig. 1). The reliability of this result has also been validated by a low standard deviation. Consequently, a slight effect on *Enterococcus sp.* persistence could be attributed to acidic pretreatment at 6 g/L. Moreover, a dose effect relationship could be statistically attributed to the acidic treatments on *Enterococcus sp.* reduction (Pearson test,  $p$ -value  $\leq 0.05$ ). Once again, the type of matrix (cow manure vs. wastewater) and obviously the acidic concentration, in addition to the kind of acid used (VFA mixture vs. performic or peracetic acid alone) could explain this result. (Luukkonen et al., 2015) reported a 3-log reduction with performic acid but a 1-log reduction was noted with peracetic acid applied to wastewater.

The raw cow manure concentration of *Clostridium perfringens* spores equaled 3.4 log. Considering the high standard deviation values and no statistical analysis difference (Tukey's

test,  $p$ -value  $\leq 0.05$ ), it is difficult to clearly draw a conclusion on the effect of acidic pretreatment on raw cow manure. Regardless of the acidic concentration used during treatment, spore concentration values were similar to those of the raw cow manure (average: 3 log CFU/g of RM). In an initial approach, the small effects on *C. perfringens* spores could be attributed to the cow manure structure and use of weak acid. Yet comparable results were obtained on vegetative forms in sewage sludge using a strong acid (hydrochloric acid) pretreatment (Tommasi et al., 2008). The mixture of acid used could provide a better explanation or understanding. (Valenzuela-Martinez et al., 2010) and (Li et al., 2012) reported respectively 7 and 3-log reductions of spore germination and outgrowth with only an acetic acid pretreatment of meat (ground turkey roast and roast beef) on *C. perfringens*.

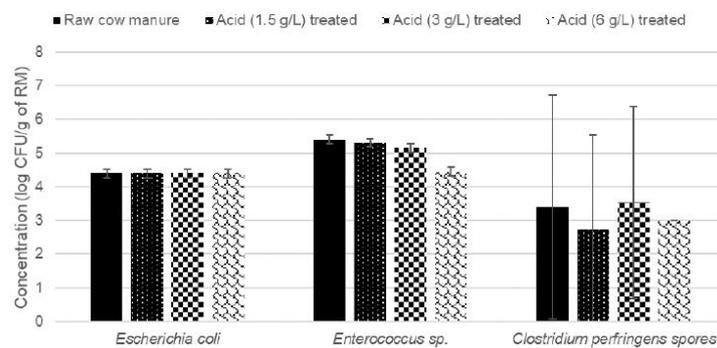


Fig. 1: Pathogen concentrations in cow manure, raw vs. with acidic pretreatments (1.5, 3, 6 g/L)

#### Thermal pretreatment

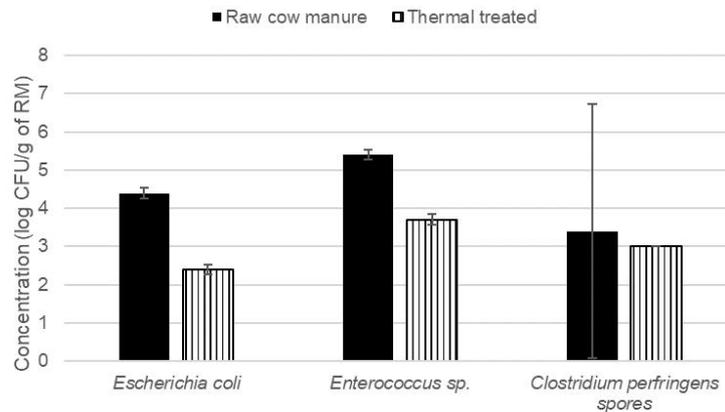
The influence of thermal pretreatment (1 hour at 70°C) on pathogen concentrations is presented in Figure 2. Like for the previous pretreatment, the standard deviation is highly reliable for *Escherichia coli* and *Enterococcus sp.* enumeration steps.

Thermal pretreatment has produced some noticeable effects on fecal contamination indicators. A 2-log reduction in *Enterococcus sp.* was induced by thermal pretreatment and a decrease from 4.4 log to 2.4 log CFU/g of RM for *Escherichia coli* (Fig. 2).

Pasteurization (1 hour at 70°C) is recognized as a good thermal treatment for these species (Watcharasukarn et al., 2009); however, results in the literature show variations in fecal contamination indicator resistance. (Liu et al., 2019) demonstrated that after 1 minute at 70°C, a full inactivation of *E. coli* and *Enterococcus faecalis* could be observed. The inclusion of pathogens in a complex matrix (in terms of composition and physical structure) could explain the need for longer treatment times (Shin et al., 2006). The physical diffusion of heating in a complex matrix could partially explain the difference between pure culture and jumbled matrix bacteria.

The problem of a high standard deviation for spore enumeration was similar to that of the previous experiment conducted with acids. Nevertheless, regarding *Clostridium perfringens* spores, it could be assumed that the thermal pretreatment did not produce any decrease in concentration (from 3.4 log to 3 log CFU/g of RM). These results seem to not be correlated with the matrix structure and composition; note that similar results have been obtained on other types of matrices treated under comparable conditions, e.g. solids separated from pig manure (Pourcher et al., 2009). Despite the difference in studied inputs relative to

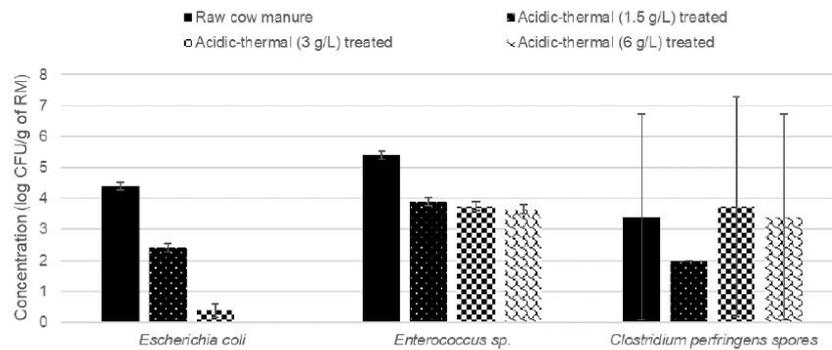
those observed in our analysis, a consensus on the weak effect of thermal pretreatment on *C. perfringens* spores can be highlighted.



**Fig. 2:** Pathogen concentrations in cow manure, raw vs. with thermal pretreatment (1 hour at 70°C)

#### Acidic-thermal pretreatments

The impacts of acidic-thermal pretreatments on fecal contamination indicators and *C. perfringens* spore concentrations are described in Figure 3.



**Fig. 3:** Pathogen concentrations in cow manure, raw vs. with acidic-thermal pretreatment (1.5, 3, 6 g/L + 1 hour at 70°C)

This acidic-thermal pretreatment has apparently altered the *Escherichia coli* concentration in cow manure. Acidic-thermal pretreatments applied to farm input had an increasing impact in terms of reducing *E. coli* concentration. At the highest acidic-thermal condition (6 g/L + 1 hour at 70°C), *E. coli* totally disappeared in cow manure (Fig. 3). A synergistic effect between acidic and thermal treatments on the level of reduction for these two pathogens has been demonstrated by our analysis. This effect has been corroborated by studies on other matrices (Shin et al., 2006). No statistical analysis could be applied because *E. coli* concentration in acidic-thermal treated samples was equal to 0 CFU/g of RM.

Moreover, under these conditions, the *Enterococcus sp.* concentration was clearly affected by the treatment as well. The concentration decrease varied from a 1.5-log reduction after acidic-thermal at 1.5 g/L, to a 1.6-log reduction after acidic-thermal at 3 g/L and ultimately to a 1.7-log reduction obtained after acidic-thermal at 6 g/L. Considering the low standard deviation, the results observed at 3 and 6 g/L are quite comparable, meaning that the higher acidic concentrations combined with thermal pretreatment resulted in a slightly stronger decrease of *Enterococcus sp.* levels in cow manure. Considering statistical analysis, no significant difference could be demonstrated between control sample and acidic-thermal treated samples (Tukey's test, p-value  $\leq 0.05$ ).

As for the *Clostridium perfringens* spore enumeration, considering that the standard deviation remains comparable across all samples (although very high), a discussion on the various samples could be beneficial. Pathogens did remain in the samples treated with the highest concentrations, but a slight decrease could be observed with acidic-thermal (1.5 g/L) pretreated cow manure: a 2 log CFU/g of RM reduction was indeed measured. For other samples, non-significant effects on spores could be demonstrated.

(Salsali et al., 2008) showed the effects on *C. perfringens* persistence after an acidic-thermal treatment, although the origin of the waste was completely different; it was a mixture of primary and thickened waste activated sludge. Differences in the structure and composition of cow manure and sludge definitely impact treatment efficiency. It could be assumed that sludge structure allows for a better diffusion of acid and/or heating compared with cow manure. Also, (Salsali et al., 2008) did not focus on spores, but included vegetative cells of *C. perfringens* as well. Another study solely focused on spores and did not show a significant reduction after acidic-thermal treatment (Bauza-Kaszewska et al., 2014), which could in fact confirm our data.

As mentioned above, all these treatments are energy consuming and costly. It is important therefore to determine whether the energy and money required for pathogen removal could be offset with increased biogas production.

#### **Effect of pretreatments on methane production**

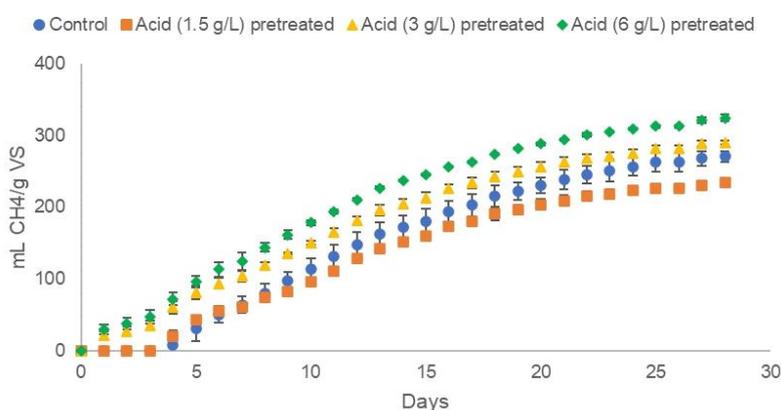
BMP tests were carried out under thermophilic conditions (55°C) for about 28 days (until reaching the end of the methane production cycle). Figures 4, 5 and 6 and Tables 3, 4 and 5 express methane production in mL CH<sub>4</sub>/g of VS (Volatile Solids) of pretreated cow manure. For all experiments, the values associated with cow manure (without any treatment) served as a control for both the anticipated methane production and kinetics.

##### Acidic pretreatments

The volumes of methane produced by cow manure subjected to acidic pretreatments are depicted in Figure 4 and Table 3. In the control (raw cow manure) sample, a four-day lag phase was observed before the start of methane production. The overall methane production after 28 days equaled 270 mL CH<sub>4</sub>/g VS. Production values between raw cow manure and pretreated cow manure at a low acidic concentration (1.5 g/L) were superimposed, with a four-day lag phase, even though slightly lower values were observed at the end of the test (after around 25 days). Overall methane production was very close to the control, at a value of 234 mL CH<sub>4</sub>/g VS. However, means comparison by Tukey's test revealed a significant difference between control and acid-treated (1.5 g/L) cow manure (p-value  $\leq 0.0001$ ). Interestingly, the pretreatment of cow manure at the higher acidic concentrations of 3 and 6 g/L led to a significant increase in methane production compared with the control. The respective overall production was 290 and 324 mL CH<sub>4</sub>/g VS respectively for 3 g/L and 6 g/L pretreated cow

manure (Table 3). Statistical analysis confirmed this difference between control and pretreated (3 and 6 g/L) cow manure (Tukey's test,  $p \leq 0.0001$ ). Moreover, no lag phase appeared, as methane production started immediately (Fig. 4). The kinetics of methane production were comparable and superimposed for the two higher acidic concentrations (3 and 6 g/L). During our analysis, the highest acidic concentration (6 g/L) resulted in a 20% increase in methane production yield. This phenomenon was previously observed in the acidic pretreatment of waste activated sludge, leading to a methane production yield increase ranging from 14.3% (Devlin et al., 2011) to 16% (Wei et al., 2018) and up to 20% (Sun et al., 2018) by using peracetic acid or free nitrous acid.

Acids could (under specific conditions) break down refractory compounds like lignin or cellulose (contained in manure) into smaller byproducts (Li et al., 2021). It could then be hypothesized that acidic treatment can ease acidogenesis (first step of anaerobic digestion) and lead to organic matter release, which in turn can enable greater and faster methane production.



**Fig. 4:** 28-day evolution in methane kinetics of BMP tests on cow manure, raw vs. acidic pretreatments

**Table 3:** Total CH<sub>4</sub> production from cow manure after 28 days, raw vs. acidic pretreatment (1.5, 3, 6 g/L)

	Raw cow manure (control)	Acid (1.5 g/L) treated cow manure	Acid (3 g/L) treated cow manure	Acid (6 g/L) treated cow manure
Total methane production (mL CH <sub>4</sub> /g VS)	270 ± 5	234 ± 1	290 ± 1	324 ± 3

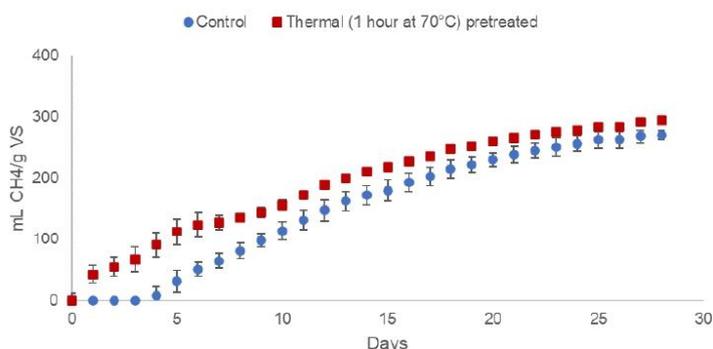
#### Thermal pretreatment

The methane production after thermal (1 hour at 70°C) pretreatment of cow manure was compared with that in the control sample (untreated cow manure) (Fig. 5). After 28 days at 55°C, methane production was slightly higher in the pretreated sample vs. the control: 294 mL CH<sub>4</sub>/g Volatile Solids (VS) for thermally-pretreated cow manure vs. 270 mL CH<sub>4</sub>/g VS for raw manure (Table 4). Thermal pretreatment increased the methane production yield (by around 9%) and statistical analysis confirmed this difference (Tukey's test,  $p \leq 0.0001$ ). The

methane production kinetics were completely different from one sample to the other. At the beginning of the process (Fig. 5), methane production started immediately in the thermally-pretreated sample, whereas a lag time (of about 4 days) in methane production was observed in the control (untreated). Initially, the curve of the thermally-pretreated sample lies clearly above the control curve. After 10 days however, the methane production curve of the thermally-pretreated sample approaches the control curve, until being superimposed with the control methane production. Thermal pretreatment only affected the first ten days, whereas the improvement in methane production for the acidic pretreatment samples (at a level of 3 and 6 g/L) was constant throughout the 28 days (Fig. 4).

The improved methane production during the first ten days could likely be attributed to solubilized organic matter, thus increasing substrate availability and methane production (Nazari et al., 2017). The thermal process acted on cell membrane permeability, promoting organic matter release. Then, the organic particles were rapidly converted into biogas, and anaerobic digestion began as of the first day (Li et al., 2021).

Lastly, the methane yield was not consistently affected by thermal pretreatment (only a 9% change). Previous studies also described non-significant effects of a 70°C pretreatment on methane production for thickened activated sludge (Appels et al., 2010). Higher temperatures were needed (80° or 90°C) to observe an increase in biogas production.



**Fig. 5:** 28-day evolution in methane kinetics of BMP tests on cow manure, raw vs. thermal pretreatment (1 hour at 70°C)

Table 4: Total CH<sub>4</sub> production from cow manure after 28 days, raw vs. thermal pretreatment (1 hour at 70°C)

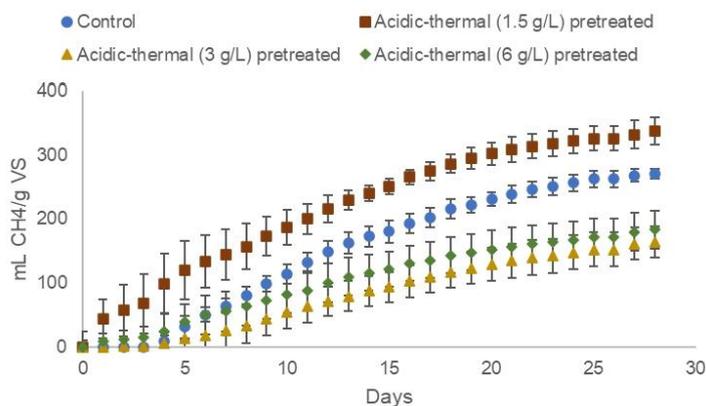
	Raw cow manure (control)	Thermally-pretreated manure
Total methane production (mL CH <sub>4</sub> /g VS)	270 ± 5.8	294 ± 1

#### Acidic-thermal pretreatments

Figure 6 and Table 5 describe the results of cumulative methane production when acid was combined with temperature during pretreatment of the sample. Cow manure samples were pretreated with the 3 different acidic concentrations (1.5, 3 and 6 g/L). Then, they were all pretreated 1 hour at 70°C, and their methane production was compared with the control

(untreated). The methane production value of the control equaled 270.4 mL CH<sub>4</sub>/g VS. As opposed to what was observed in Part 1 of this section, high acidic concentrations (3 and 6 g/L) in combination with thermal pretreatment (1 hour at 70°C) led to lower methane production. After 28 days at 55°C, acidic-thermal pretreated cow manure samples produced 164 mL CH<sub>4</sub>/g VS and 183 mL CH<sub>4</sub>/g VS for respective acidic concentrations of 3 g/L and 6 g/L. These results correspond to a decreased methane production yield of 39% and 32%, respectively, for acidic concentrations of 3 and 6 g/L. Moreover, a four-day production lag phase, comparable to that of the control, was observed (Fig. 6). This lag was not observed either for high acidic concentration pretreatment or for thermal pretreatment alone, where methane production started up immediately. Pretreatments, resulting from the combination of high acidic (3 or 6 g/L) concentrations combined with 1 hour at 70°C, could be described as detrimental to overall methane production and kinetics (i.e., lag phase). Furthermore, means comparison depicted a significative difference between acidic-thermal (3 or 6 g/L) pretreated cow manure and raw cow manure (Tukey's test,  $p \leq 0.0001$ ).

Surprisingly, the combination of low acidic concentration (1.5 g/L) with a 70°C thermal pretreatment did lead to increased methane production. Overall production of the pretreated sample equaled 337 mL CH<sub>4</sub>/g VS compared with 270 mL CH<sub>4</sub>/g VS for the control (raw manure) (Table 5), thus corresponding to a 25% increase in methane yield. This pretreatment could be considered as a factor in enhancing methane production without any lag phase (Tukey's test,  $p$ -value  $\leq 0.01$ ).



**Fig. 6:** 28-day evolution in methane kinetics of BMP tests on cow manure, raw vs. acidic-thermal pretreatment (1.5, 3, 6 g/L + 1 hour at 70°C)

**Table 5:** Total CH<sub>4</sub> production from cow manure after 28 days, raw vs. acidic-thermal pretreatment (1.5, 3, 6 g/L + 1 hour at 70°C)

	Raw cow manure (control)	Acidic-thermal (1.5 g/L) treated cow manure	Acidic-thermal (3 g/L) treated cow manure	Acidic-thermal (6 g/L) treated cow manure
Total methane production (mL CH <sub>4</sub> /g VS)	270 ± 5	337 ± 21	164 ± 25	183 ± 29

In view of the previous results obtained, when acidic and thermal pretreatments were introduced separately, positive effects on methane production were observed. Separately, they were seen to ease the step of solubilizing organic matter, thus increasing overall methane production and suppressing the lag phase (see previous section). The combination of high acidic concentrations with temperature (70°C) as a pretreatment has also therefore been implemented with the objective of combining their positive effects on biogas production.

The analysis of this experiment reveals that results were completely different from those anticipated. Experiments conducted using acidic-thermal pretreatments to enhance biogas production are scarce, but according to (Passos et al., 2017), methane production can be increased by 20% with an acidic-thermal pretreatment on cow manure. The acid employed was hydrochloric acid and a 100°C temperature was applied. An acidic-thermal pretreatment may actually imply very complicated mechanisms depending on the type of acid used and the temperature level applied.

### **Conclusion**

In conclusion, the various pretreatments applied herein to cow manure before thermophilic anaerobic digestion have indeed led to a decrease in the two pathogens chosen, i.e. *Escherichia coli* and *Enterococcus sp.*, with the exception of *C. perfringens* spores. The concentrations of fecal contamination indicators (*E. coli* and *Enterococcus sp.*) have sharply declined with acidic-thermal pretreatments. These effects became increasingly significant as the acidic concentration increased (from 1.5 to 6 g/L). However, *Clostridium* spores were so resistant that they were able to survive despite the treatments applied to cow manure. The biomethane production yield was evaluated for all samples. Since acidic-thermal pretreatments provided good results in terms of pathogen removal, increased methane production was indeed anticipated, especially at high acidic concentrations. Yet, we observed completely opposite results: methane production was inhibited under conditions corresponding to the highest pathogen removal rate. The type of acid used and temperature level applied can probably explain these results. Moreover, at full scale plant, these kinds of treatments could be applied because VFA are naturally present during anaerobic digestion and could be used as pretreatments. Besides, thermal treatment is often requested before anaerobic digestion when using animal by-products as substrates. Further investigation is definitely required. *C. perfringens* persistence after pretreatment does remain a problem. Understanding these mechanisms is impossible in a complex matrix. Our understanding could be improved if these pretreatments were applied to a pure culture of *C. perfringens*. The use of an efficient technique, like flow cytometry or imaging flow cytometry, should thus be pursued in order to shed new light into understanding the mechanism of *C. perfringens* resistance to acidic and thermal treatments.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Nouvelle Aquitaine Region (France) through the Valcofruit Project. The authors wish to thank all members of the PEIRENE Laboratory (Limoges, France) for facilitating the experimental work performed herein.

## References

- Appels, L., Degrève, J., Van der Bruggen, B., Van Impe, J., Dewil, R., 2010. Influence of low temperature thermal pre-treatment on sludge solubilisation, heavy metal release and anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 101, 5743–5748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.068>
- Bachmann, N., Deront, M., Fruteau, H., Holliger, C., Membrez, Y., Wellinger, A., 2011. Optimisation des tests standardisés de digestibilité dans des réacteurs batch (No. 154365/103311). Office fédéral de l'énergie, Lausanne.
- Bauza-Kaszewska, J., Paluszak, Z., Keutgen, A.J., 2014. Effect of formic acid and heat treatment on *Clostridium sporogenes* spores inactivation in animal by-products. *Med. Weter.* 5.
- Bouaouine, O., Bourven, I., Khalil, F., Baudu, M., 2020. Reuse of olive mill wastewater as a bioflocculant for water treatment processes. *Journal of Cleaner Production* 246, 119031. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119031>
- Bridgewater, L.L., Baird, R.B., Eaton, A.D., Rice, E.W., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (Eds.), 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition. ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Devlin, D.C., Esteves, S.R.R., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2011. The effect of acid pretreatment on the anaerobic digestion and dewatering of waste activated sludge. *Bioresource Technology* 102, 4076–4082. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.043>
- European Union, n.d. European Union. Commission Regulation (EU) No 142/2011 of 25 February 2011 Implementing Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council Laying down Health Rules as Regards Animal By-Products and Derived Products Not Intended for Human Consumption and Implementing Council Directive 97/78/EC as Regards Certain Samples and Items Exempt from Veterinary Checks at the Border under That Directive.
- Jarvis, B., Wilrich, C., Wilrich, P.-T., 2010. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values: Derivation of MPNs and their parameters. *Journal of Applied Microbiology* no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x>
- Khanh Nguyen, V., Kumar Chaudhary, D., Hari Dahal, R., Hoang Trinh, N., Kim, J., Chang, S.W., Hong, Y., Duc La, D., Nguyen, X.C., Hao Ngo, H., Chung, W.J., Nguyen, D.D., 2021. Review on pretreatment techniques to improve anaerobic digestion of sewage sludge. *Fuel* 285, 119105. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119105>
- Kuglarz, M., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2013. Microwave and thermal pretreatment as methods for increasing the biogas potential of secondary sludge from municipal wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 134, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.001>
- Kumar, R.R., Park, B.J., Cho, J.Y., 2013. Application and environmental risks of livestock manure. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56, 497–503. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3184-8>
- Li, L., Valenzuela-Martinez, C., Redondo, M., Juneja, V.K., Burson, D.E., Thippareddi, H., 2012. Inhibition of *Clostridium perfringens* Spore Germination and Outgrowth by Lemon Juice and Vinegar Product in Reduced NaCl Roast Beef. *Journal of Food Science* 77, M598–M603. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02922.x>
- Li, Y., Zhao, J., Krooneman, J., Euverink, G.J.W., 2021. Strategies to boost anaerobic digestion performance of cow manure: Laboratory achievements and their full-scale application potential. *Science of The Total Environment* 755, 142940. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142940>
- Liu, X., Lendormi, T., Lanoisellé, J.-L., 2021. Conventional and Innovative Hygienization of Feedstock for Biogas Production: Resistance of Indicator Bacteria to Thermal Pasteurization, Pulsed Electric Field Treatment, and Anaerobic Digestion. *Energies* 14, 1938. <https://doi.org/10.3390/en14071938>

- Liu, X., Lendormi, T., Le Fellic, M., Lemée, Y., Lanoisellé, J.-L., 2019. Hygienization of mixed animal by-product using Pulsed Electric Field: Inactivation kinetics modeling and recovery of indicator bacteria. *Chemical Engineering Journal* 368, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.158>
- Lopes, B.C., Machado, E.C., Rodrigues, H.F., Leal, C.D., Araújo, J.C. de, Teixeira de Matos, A., 2020. Effect of alkaline treatment on pathogens, bacterial community and antibiotic resistance genes in different sewage sludges for potential agriculture use. *Environmental Technology* 41, 529–538. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1505960>
- Luukkonen, T., Heyninck, T., Rämö, J., Lassi, U., 2015. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. *Water Research* 85, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.037>
- Mani-López, E., García, H.S., López-Malo, A., 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International* 45, 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>
- Nazari, L., Yuan, Z., Santoro, D., Sarathy, S., Ho, D., Batstone, D., Xu, C. (Charles), Ray, M.B., 2017. Low-temperature thermal pre-treatment of municipal wastewater sludge: Process optimization and effects on solubilization and anaerobic degradation. *Water Research* 113, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.055>
- 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>
- Passos, F., Ortega, V., Donoso-Bravo, A., 2017. Thermochemical pretreatment and anaerobic digestion of dairy cow manure: Experimental and economic evaluation. *Bioresource Technology* 227, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.034>
- Pourcher, A.-M., Burton, C., Ziebal, C., De-Guardia, A., 2009. Impact of temperature-time combinations on enteric bacteria in separated solids from pig manure 5.
- Salsabil, M.R., Prorot, A., Casellas, M., Dagot, C., 2009. Pre-treatment of activated sludge: Effect of sonication on aerobic and anaerobic digestibility. *Chemical Engineering Journal* 148, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.09.003>
- 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 J Microbiol Biotechnol* 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. *Can. J. Microbiol.* 52, 279–286. <https://doi.org/10.1139/w05-125>
- 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>
- Seruga, P., Krzywonos, M., Paluszak, Z., Urbanowska, A., Pawlak-Kruczek, H., Niedźwiecki, Ł., Piñkowska, H., 2020. Pathogen Reduction Potential in Anaerobic Digestion of Organic Fraction of Municipal Solid Waste and Food Waste. *Molecules* 25, 275. <https://doi.org/10.3390/molecules25020275>
- Shin, J.-H., Lee, S.-Y., Dougherty, R.H., Rasco, B., Kang, D.-H., 2006. Combined effect of mild heat and acetic acid treatment for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in an asparagus puree. *J Appl Microbiol* 101, 1140–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02996.x>
- Sun, D., Qiao, M., Xu, Y., Ma, C., Zhang, X., 2018. Pretreatment of waste activated sludge by peracetic acid oxidation for enhanced anaerobic digestion. *Environ. Prog. Sustainable Energy* 37, 2058–2062. <https://doi.org/10.1002/ep.12896>
- Tommasi, T., Sassi, G., Ruggeri, B., 2008. Acid pre-treatment of sewage anaerobic sludge to increase hydrogen producing bacteria HPB: effectiveness and reproducibility. *Water Science and Technology* 58, 1623–1628. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.506>

- Valenzuela-Martinez, C., Pena-Ramos, A., Juneja, V.K., Korasapati, N.R., Burson, D.E., Thippareddi, H., 2010. Inhibition of *Clostridium perfringens* Spore Germination and Outgrowth by Buffered Vinegar and Lemon Juice Concentrate during Chilling of Ground Turkey Roast Containing Minimal Ingredients†. *Journal of Food Protection* 73, 470–476. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.3.470>
- 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>
- Wei, W., Wang, Q., Zhang, L., Laloo, A., Duan, H., Batstone, D.J., Yuan, Z., 2018. Free nitrous acid pre-treatment of waste activated sludge enhances volatile solids destruction and improves sludge dewaterability in continuous anaerobic digestion. *Water Research* 130, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.050>

### III.1.3. Complément d'informations

<p style="text-align: center;"><b>Complément d'informations : Effet des pré-traitements sur le caractère hygiénisant de la méthanisation agricole du fumier en conditions contrôlées (Tests BMP).</b></p>
---

Le fumier bovin issu d'une seule et même « unité de méthanisation à la ferme » de Haute-Vienne a subi différents traitements acides, thermique et acido-thermiques. Les effets hygiénisants des traitements appliqués et leur impact sur le rendement de production de biogaz a été mesuré (cf publication). L'effet des pré-traitements sur le potentiel méthanogène a été réalisé en conditions contrôlées et communément utilisées dans le domaine *via* la réalisation de tests BMP (cf publication).

Toutes proportions gardées, on peut considérer que ces tests donnent une idée du potentiel hygiénisant de la méthanisation du fumier en conditions réelles d'exploitation. Il est, par conséquent, intéressant d'analyser rapidement les résultats obtenus en vue d'une potentielle transposition à l'échelle réelle.

L'effet hygiénisant de la méthanisation du fumier en conditions contrôlées (tests BMP) a donc été mesuré lors l'ensemble des manipulations présentées dans la publication, sur les 3 populations bactériennes cibles de notre étude. Le calcul de « l'effet hygiénisant de la méthanisation » a été mesuré par la numération de 3 espèces bactériennes au début ( $T_0$ ) et à la fin ( $T_{final}$ ) de chaque test BMP (cf ci-après).

Les conditions du test nécessitent la mise en contact du fumier traité (ou non) et aussi d'un inoculum (boues du méthaniseur de la ferme où le fumier a été prélevé). Les résultats d'hygiénisation obtenus au cours des tests BMP sont donc présentés en tenant compte de l'apport microbien issu de l'inoculum (flacon contrôle sans ajout de fumier). Les concentrations des indicateurs de contamination fécale (respectivement *Escherichia coli* et entérocoques) ont été quantifiées par microplaques (MUG et MUD) (chapitres II.1.4.2 et II.1.4.3). De plus, un dénombrement des formes totales et sporulées de *Clostridium perfringens* en tubes TSN a été mené en parallèle.

La problématique de la reproductibilité de la numération de bactéries dans des matrices complexes comme le fumier doit être prise en considération dans ce type d'études. La reproductibilité des mesures, pour les différentes espèces étudiées, est représentée par les barres d'erreur sur les graphes. Au regard des résultats obtenus sur l'erreur commise, nous avons considéré que les expériences étaient reproductibles et qu'elle pouvait faire l'objet d'une discussion.

✓ Les entérocoques :

L'abattement de la concentration en entérocoques (Figure 40), quel que soit le traitement appliqué, est inférieur à 1 log après digestion anaérobie. On observe aussi que la digestion anaérobie, dans les conditions des tests BMP, impacte peu les résultats de numération.

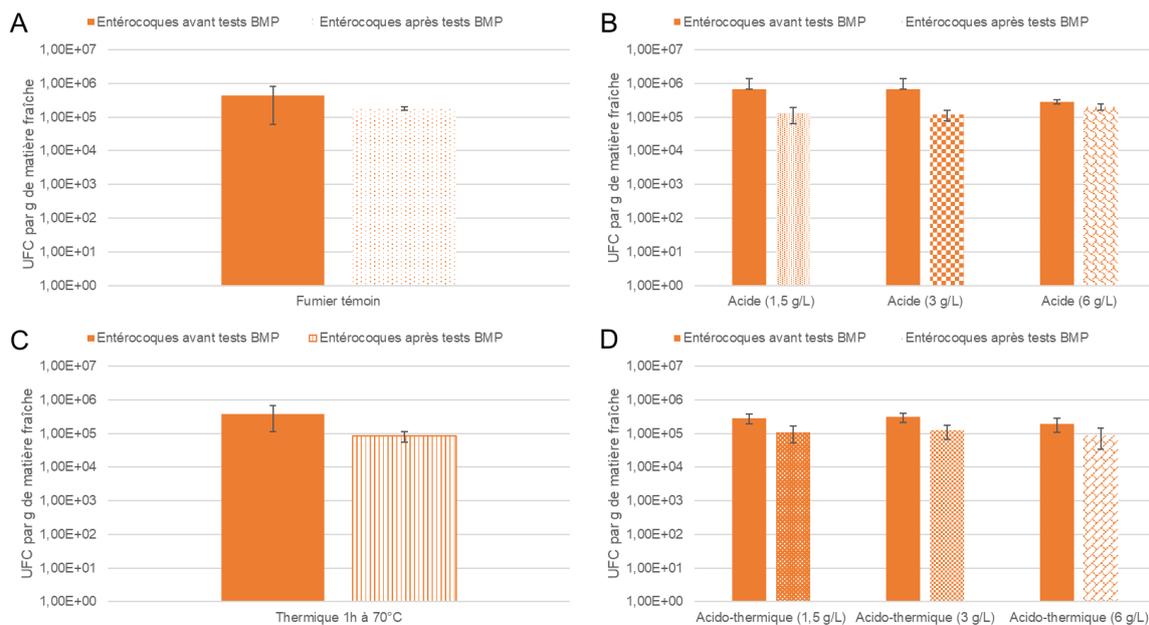


Figure 40. Concentration en entérocoques avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D).

- Le traitement thermique seul (couplé à la digestion anaérobie) entraîne un abattement légèrement plus important (0,7 log) après méthanisation que la combinaison des traitements acides et thermique (0,4 log maximum).
- Le traitement entraînant l'abattement le plus important est le traitement acide à 1,5 ou 3 g/L. Les abattements sont respectivement de 0,7 et 0,8 log après digestion anaérobie. La concentration en acides la plus forte (6 g/L) permet seulement de diminuer la concentration en entérocoques de 0,2 log.
- Par ailleurs, l'abattement de la concentration en entérocoques au sein du fumier non traité après méthanisation est aussi très faible : 0,4 log.

✓ *Escherichia coli*

L'abattement de la concentration en *Escherichia coli* est globalement légèrement supérieur à celui obtenu pour les entérocoques en dépassant 1 log (Figure 41). On observe aussi que, contrairement aux résultats de la Figure 40 (entérocoques) la digestion anaérobie, dans les conditions des tests BMP, impacte de manière plus importante les résultats de numération. Ce qui signifie un meilleur pouvoir hygiénisant.

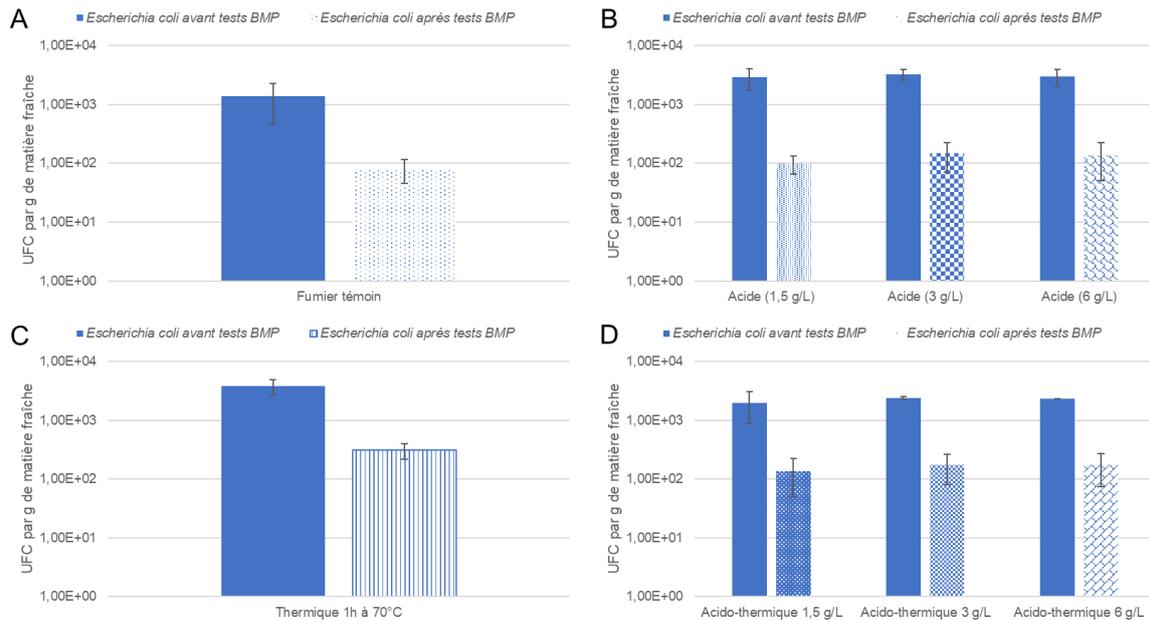


Figure 41. Concentration en *Escherichia coli* avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D).

- Le traitement thermique seul (couplé à la digestion anaérobie) permet de diminuer la concentration en *Escherichia coli* d'1,1 log après digestion anaérobie.
- Le traitement acide permet un abattement légèrement plus important que la combinaison des traitements acides et thermique. Le traitement acide seul combiné à la digestion anaérobie réduit en moyenne de 1,4 log la concentration en *Escherichia coli* dans les flacons tandis que les traitements acido-thermiques diminuent la concentration de 1,1 log.
- L'effet de la digestion anaérobie thermophile seule est quasiment équivalent à la combinaison du pré-traitement du fumier et de la méthanisation sur la réduction de *Escherichia coli*. En effet, l'abattement de la concentration de cet agent pathogène est de 1,2 log après digestion anaérobie du fumier non traité.

✓ *Clostridium perfringens*

Le potentiel hygiénisant de la digestion anaérobie couplé aux pré-traitements a été étudié en dénombrant les formes totales (incluant les formes végétatives) et sporulées de *Clostridium perfringens* (Figures 42 et 43).

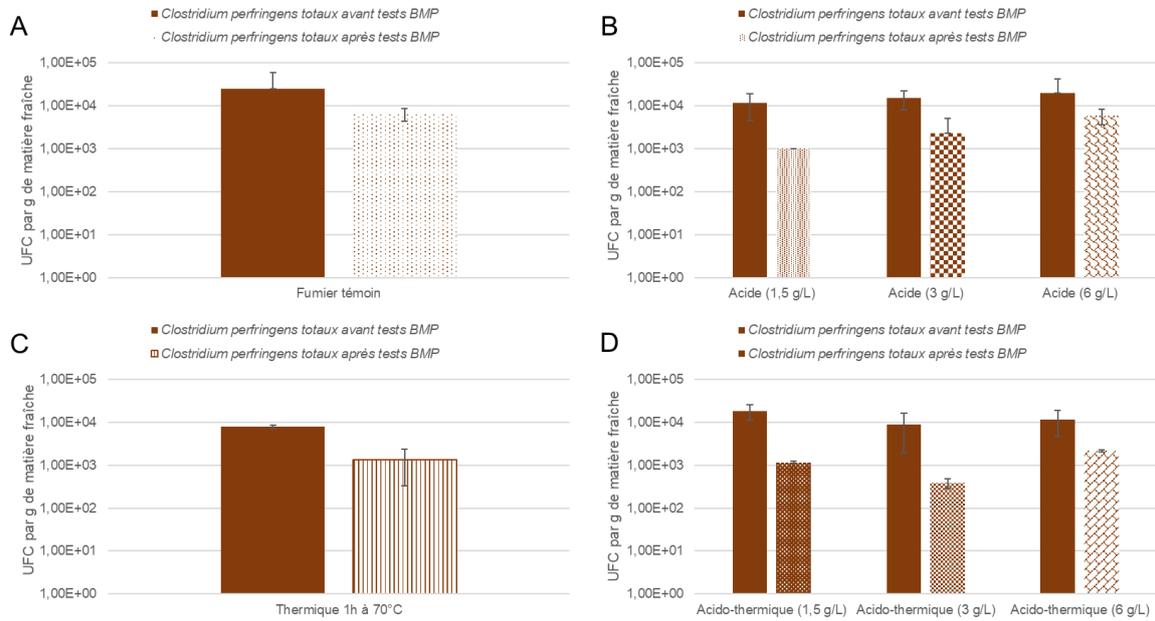


Figure 42. Concentration en *Clostridium perfringens* totaux avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D).

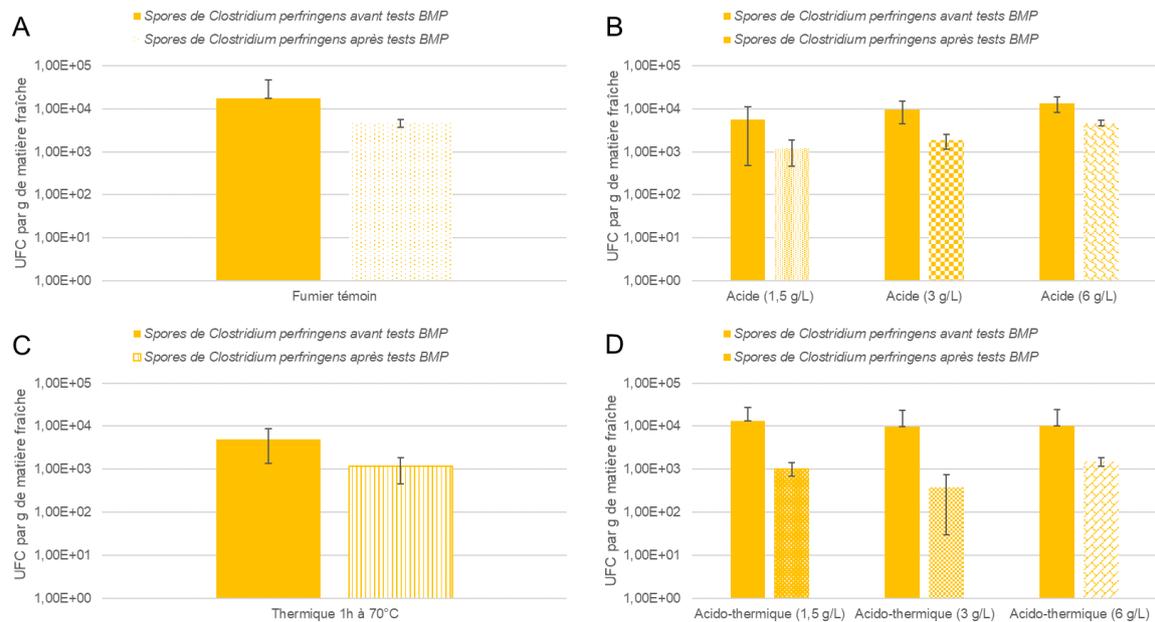


Figure 43. Concentration en spores de *Clostridium perfringens* avant et après tests BMP dans du fumier non traité (A), traité aux AGV (B), traité thermiquement (C) et traité de façon acido-thermique (D).

Les concentrations initiales en formes totales et sporulées sont quasiment identiques dans les flacons BMP contenant du fumier ayant subi un traitement thermique seul ou un traitement acido-thermique.

- Les figures 42A (témoins) et 42C (traitement thermique seul) montrent que la digestion anaérobie n'impacte pas ou quasiment pas l'hygiénisation.

- Concernant le traitement acide seul, de manière surprenante, l'abattement des formes totales de *Clostridium perfringens* est inversement proportionnel à la concentration en AGV. L'abattement varie de 1,1 à 0,5 log pour les formes totales et de 0,7 à 0,5 log pour les formes sporulées après digestion anaérobie.

- L'abattement de la concentration en formes sporulées après application du traitement thermique sur le fumier couplé à la digestion anaérobie permet un abattement moyen de 0,6 log.

- L'abattement de la concentration en spores est plus importante lorsque le fumier est pré-traité de façon acido-thermique avec des concentrations en AGV à 1,5 et 3 g/L (respectivement 1,1 et 1,4 log après méthanisation).

Le traitement acido-thermique réalisé à la concentration en AGV la plus forte (6 g/L) entraîne un abattement légèrement supérieur (0,8 log). Soit un abattement légèrement supérieur en comparaison d'un traitement thermique appliqué seul.

#### III.1.4. Conclusion

- Effet des pré-traitements sur le potentiel méthanogène et sur l'hygiénisation de l'intrant ?

Les différents pré-traitements appliqués sur le fumier bovin ont permis de diminuer la concentration des deux indicateurs de contamination fécale : *Escherichia coli* et *Enterococcus sp.* Malheureusement, aucun effet n'a pu être observé sur la concentration en spores de *Clostridium perfringens*.

Un effet dose-dépendant a pu être démontré : plus la concentration en acides du traitement acido-thermique est importante, plus l'abattement de la concentration des *E. coli* et *Enterococcus sp.* est grand. Le pré-traitement acido-thermique (concentration en acides de 6 g/L couplée à un chauffage à 70°C pendant 1 heure) a notamment permis de complètement détruire *E. coli*. Toutefois, les spores de *Clostridium perfringens* sont tellement résistantes qu'elles ont pu survivre à ces différents traitements.

Bien que ces traitements acido-thermiques fournissent de bons résultats sur la disparition des indicateurs de contamination fécale, une inhibition du potentiel méthanogène du fumier pré-traité est observée. Le type d'acides utilisés (Acides Gras Volatils) pourrait expliquer ces résultats. En effet, les AGV sont naturellement présents au cours de la digestion anaérobie et une concentration trop importante pourrait inhiber le processus de méthanisation.

➤ Effet des pré-traitements sur le potentiel hygiénisant de la méthanisation agricole de l'intrant ?

Les résultats obtenus dans les flacons témoins notés (A) montrent que la digestion anaérobie n'a un réel effet hygiénisant que sur les bactéries de type *Escherichia coli*. Cependant, cet effet hygiénisant n'est pas accru par la mise en œuvre de pré-traitement sur le fumier. Pour les entérocoques, quel que soit le pré-traitement appliqué, et ce de manière comparable au témoin non traité, il n'existe pas d'effet hygiénisant flagrant de la méthanisation. En revanche pour les bactéries de type *Clostridium*, les pré-traitements de type acide faible ou acido-thermiques, impactent de manière favorable la capacité d'hygiénisation de la méthanisation. Le traitement thermique n'a lui strictement aucun effet.

Comme cela a été souligné dans la bibliographie, le fumier est un intrant agricole qui présente une structure particulièrement complexe sur le plan de sa structure et de sa composition chimique, biochimique et microbiologique. Le fumier est constitué d'un enchevêtrement de paille et de matière organique plus ou moins dégradées. Dans cette étude nous nous sommes « affranchis » de cette problématique dans un premier temps en prélevant le fumier dans la même ferme, de la même manière et avec le même mode de stockage. Cette matrice est difficile à explorer et de nombreux facteurs peuvent interagir avec les pré-traitements appliqués.

La complexité de la matrice sur tous les plans fait qu'il est difficile de pouvoir comprendre de manière plus approfondie les mécanismes d'action des pré-traitements non seulement sur la structure macroscopique de la matrice complexe (174) mais aussi sur les cellules bactériennes qui constituent le cœur du problème de l'hygiénisation.

Dans la suite de ce travail (Chapitres III.2 et III.3), nous avons cherché à élucider les mécanismes d'actions à l'échelle de la cellule. Pour ce faire, les mêmes pré-traitements que ceux utilisés sur le fumier brut (acides, thermique, acido-thermiques), ont été appliqués à une culture pure bactérienne. Le micro-organisme choisi pour la suite du travail est *Clostridium perfringens* du fait de la complexité du fonctionnement de ce micro-organisme qui le rend très résistant aux traitements d'hygiénisation comme nous avons pu le voir dans la publication. Pour cela, des techniques d'analyse telles que la cytométrie ou l'imagerie en flux ont été employées afin de comprendre les potentiels effets engendrés par les différents traitements sur *Clostridium perfringens*.

## III.2. Application des pré-traitements sur une culture pure de *Clostridium perfringens* : analyse des effets par cytométrie en flux

### III.2.1. Objectifs et stratégie

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les effets des différents traitements (acides, thermique, acido-thermique) sur les formes végétatives, en cours de sporulation et sporulées d'une culture pure de *Clostridium perfringens*. Pour cela, une culture biphasique est entreprise (172). Les formes végétatives de *Clostridium* ont pu croître dans le milieu TSB pendant 24 heures. Puis, afin d'obtenir des formes en cours de sporulation et sporulées, les bactéries ont été transférées au sein du milieu Duncan Strong. Le traitement thermique appliqué est un chauffage des bactéries au bain-marie à 70°C pendant 1 heure. Différentes concentrations en acides sont testées (1,5, 3 et 6 g/L) (66) et différents temps d'incubation avec les acides sont analysés (0, 24 et 48 heures) au sein du milieu Duncan Strong. Enfin, le traitement acido-thermique est l'association des deux traitements cités auparavant. L'analyse des effets est permise par l'utilisation de la cytométrie en flux (CMF), technique de dénombrement rapide (147). Pour cela, après application du/des traitement(s) sur *C. perfringens*, un double marquage est réalisé avec le CFDA (marqueur d'activité enzymatique) et l'iodure de propidium (marqueur d'intégrité membranaire).

Les résultats obtenus sur cette partie du travail sont présentés sous la forme d'une publication.

**Evaluation of additive effects of volatile fatty acids and moderate heat treatment for enhancing inactivation of vegetative forms and spores of *Clostridium perfringens* by flow cytometry.**

# Evaluation of additive effects of volatile fatty acids and moderate heat treatment for enhancing inactivation of vegetative forms and spores of *Clostridium perfringens* by flow cytometry

Keywords : *Clostridium perfringens*, sporulation capacity, endospores, volatile fatty acids, pasteurization, flow cytometry;

Highlights : bactericidal solutions against *Clostridium perfringens*, Action mechanism of volatile fatty acids

## Introduction

Anaerobic digestion (AD) is a sustainable technology for converting organic waste into biogas. The solid by-product of AD, the digestate, is generally used as fertilizer or as a soil amendment in current crop management. A large variety of micro-organisms is involved in organic matter conversion into biogas. Among these bacteria, clostridia, which are endospore-forming bacteria, are naturally present and mainly brought by the digester's feeding (like slurry manure or sludge). Therefore, they contaminate the biogas plant and of course the digestate. Identified pathogenic representatives of this cluster are for example *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* and *C. tetani* ([1] [2] [3] Bagge et al. 2010, Le Maréchal et al. 2019, Lüdecke et al. 2020). Bacterial spores are dormant forms of vegetative cells that can develop and cause intoxication at once the environment conditions allow their development. The presence of pathogens in organic waste, especially spore-forming bacteria, is of growing concern for public health since the relation between the use of digestate as soil amendment and human disease remains unclear ([4] Liu et al. 2019). Because of their high resistance to conventional hygienization processes, more innovative sanitation approaches are needed. Different hygienization treatments are described but there is a lack of data concerning the mechanisms involved. Thus, a more thorough insight is needed to understand the mechanisms involved (membrane cell permeation, enzymatic activities' inhibition, ...) during treatment to inactivate both vegetative and spores' forming *Clostridium* bacteria.

As well described by several authors, through sporulation, spore-forming bacteria can establish a complex structure, including spore core, cortex region, and coat layers, in order to protect themselves from adverse conditions ([5] [6] [7] Jaam et al. 2016 and 2017, Mah et al., 2008). The spores' coat is composed of a thick proteinaceous multi-layered structure made up of highly cross-linked polypeptides that confers spore resistance to some chemical and lytic enzymes but plays little or no role in heat resistance ([7] Mah et al. 2008). The spore core is the analogue of the protoplast of a growing cell and includes DNA, ribosomes, and tRNA. It also contains large amounts of pyridine-2,6- dicarboxylic acid (dipicolinic acid [DPA]) chelated in a 1:1 ratio with Ca<sub>2</sub> (CaDPA) that also contribute to the extreme resistance of the spores ([8] Borsch et al.). Finally, the cortex of the spore is made of peptidoglycan and occupies as much as half the spore volume ([7] [5] [8] [9] Mah et al., El Jaam et al. 2016, Borch et al. 2017 Setlow et al. 2006). The cortex of the spore is the essential part involved in spore heat resistance ability.

Several technologies and treatments have been developed and applied for many years in order to control spoilage and pathogenic micro-organisms in different matrices. However, the removal of resistant pathogens and bacterial endospores in the specific field of hygienization of biowaste is of growing interest mainly due to the use of biowaste as fertilizers. Total removal of pathogenic bacteria in biowaste remains difficult, whatever the process used, probably because of the complexity of the matrix structure. Thus explaining why the impact of specific treatment (as physical or chemical treatment) is still poorly understood. To date, thermal processing is still commonly used to inactivate spores in food matrix. However, even if from an energetic and economical point of view, thermal pre-hygenization of waste is generally the most cost-effective treatment ([4] Liu et al. 2019), alternative methods have to be developed to improve efficiency of spore removal. According to [10] Ross et al. 2003, combining two or more nonthermal processes (as ultrasonication, high pressure, pulsed electric fields, acidification...) can also enhance microbial inactivation and allows the use of lower individual treatment intensities. Volatile fatty acids and their various salts are frequently used as food additives and preservatives but could also have interesting applications in biowaste hygienization ([11] [12] [13] Bauza-Kaszewska et al. 2014, Salsali et al. 2006 and 2008).

Volatile fatty acids are known to affect vegetative cell activity by two main mechanisms: cytoplasmic acidification with subsequent uncoupling of energy production and regulation, and accumulation of the dissociated acid anion to toxic levels ([14] [10] Mani-Lopez et al. 2012, Ross et al. 2003). To our knowledge, few information are available on the bactericidal effects of volatile fatty acids treatment against *C. perfringens*. One explanation could be that the complex structure of spores has limited their detection and characterization methods compared to vegetative cells. In this context, flow cytometry (FCM) could be considered as a suitable method to characterize micro-organisms at single cell level. It is a fast method to obtain multi-parametric data of individual cells from thousands of them within a sample (Cronin et al. 2010). Fluorescent dyes can provide much better information of cell properties such as viability or physiological state of cells compared to other methods. Recently, [15] Ganguly et al. (2020) have developed an efficient method using a combination of FCM and FACS (Fluorescence-assisted cell sorting) to quantify culture heterogeneity of *P. thermosuccinogenes*.

Most of the time, the determination of process efficiency on the removal of different bacteria gender is evaluated through conventional microbiological methods like the enumeration of bacterial populations (before and after acidic or thermal treatment). To our knowledge, few information is available on the mechanisms involved in the inactivation of *Clostridium perfringens* by a combined application of volatile fatty acids and moderate heat treatment at cell level. Thus, only partial or no information is available concerning the structural changes induced in bacterial spores after treatment. In this study efforts were made to bring more accurate information and quantification on the impact of thermal, acidic and combined VFA-thermal treatments (Volatile Fatty Acids) not only to inactivate vegetative cells but also to limit sporulation ability of *Clostridium perfringens*.

## Material and methods

### *Bacterial strain and culture conditions*

The strain of *Clostridium perfringens* type A used in this study was purchased from the Pasteur Institute (CIP collection: CIP 60.60). A pure culture of this strain was maintained in a Tryptic

Sulfit Neomycin medium (TSN, Biokar Diagnostics®) at 46°C under anaerobic conditions (GasPakEZ® Anaerobe Container System Sachets with Indicator, BD®). The following cultivating methodology was adapted from Abbas et al. (2014). This technique has the advantage to produce spores in a two-step process: the first step consists in a first vegetative growth (in TSB) for 24h followed by a transferred in a specific spore forming medium (DS). This biphasic culture method allows to distinguish treatment effects on cells (i.e., vegetative and spores) and sporulation capacity. A colony of *Clostridium perfringens* was transferred to Trypto casein Soy Broth medium (TSB, Biokar Diagnostics®) and incubated in 20 ml during 24 hours at 37°C corresponding to the best conditions for vegetative cells growth. Then, 7.5 mL of this culture were separated by centrifugation (15 minutes, 2000 g) and washed twice with sterile physiological saline solution. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 20 mL of modified Duncan Strong medium (QB-39-11-56, Nutri-Bact®) at 37°C which served as the culture media for treatment experiments. To obtain anaerobic conditions for TSB and DS media, paraffin oil (Sigma-Aldrich®) was added and vessels (tubes and Erlenmeyer flasks) were sealed with a cap. The cultures obtained and served for the treatments are described below and on Figure 1. Under those conditions, the bacteria are mainly in vegetative forms.

#### *Treatments applied to C. perfringens*

The effect of each treatment was firstly investigated separately: for one part, the thermal treatment and for the other part, the VFA treatment. Then, the effect of combined treatment was assessed as shown on Figure 1.

- 1) 1.5 mL of sample from DS media were submitted to heat treatments at 70°C for 1 hour in a water bath. The treatment timing started when the core temperature of test tube reached the target temperature. After 1 hour of thermal treatment, heated samples were immediately cooled and stored in an ice bath until their analysis. As shown on Figure 1 the treatment was applied separately at  $T_0$ ,  $T_{24h}$  and  $T_{48h}$ .
- 2) Acidic treatments consisted in an equimolar mixture of volatile fatty acids (VFA): acetic (Carlo Erba®), propionic and butyric acids (Acros Organics®). These acids were added in DS media to obtain 3 different conditions of VFA concentrations of 1.5 g/L, 3 g/L and 6 g/L ([13] Salsali et al., 2008). The effects of VFA treatment on *Clostridium perfringens* cultures (i.e., vegetative cells and spores) were assessed during 48h after VFA addition at ( $T_0$ ) (serves as a reference). Samples were collected and analysed after 24 hours ( $T_{24}$ ) and 48 hours ( $T_{48}$ ) of incubation at 37°C.
- 3) To study effects of combined treatments, VFA (1.5 g/L, 3 g/L and 6 g/L) were added at  $T_0$  in the same conditions as those described above. Then, samples were heated (70°C during one hour) at initial time ( $T_0$ ) (serves as reference samples), after 24 hours ( $T_{24}$ ) and 48 hours ( $T_{48}$ ) of incubation at 37°C with VFA.

For each treatment, alone and combined, the experiments were performed three times independently ( $n = 3$ ) and the results are expressed as mean value  $\pm$  standard deviation.

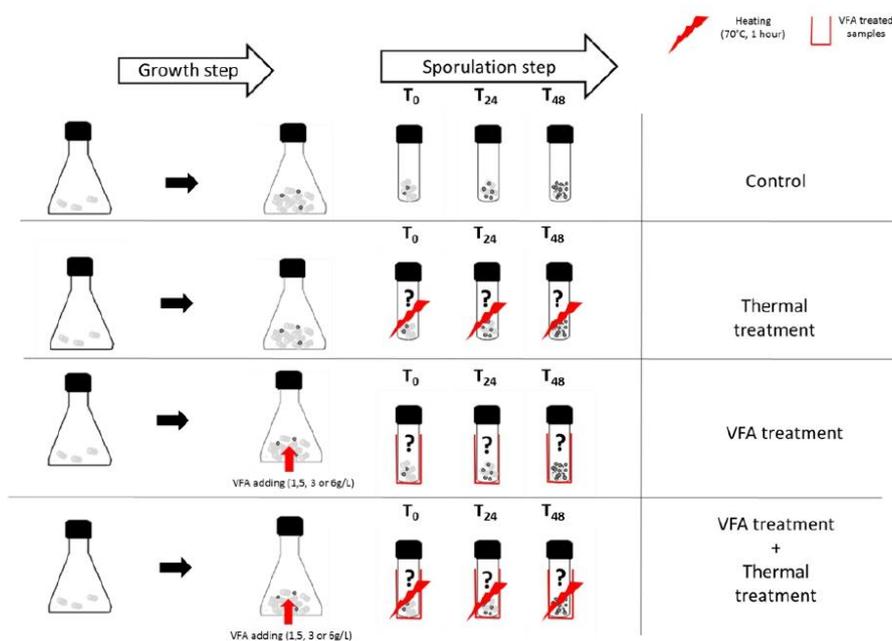


Figure 1: Visualization of the experimental design of *Clostridium perfringens* culture conditions for the control (A) and treated samples: thermal treatment alone (B) VFA treatment alone (C) and VFA/thermal combined treatments (D)

#### Cell staining procedure and flow cytometry analysis

Flow cytometry analyses was used to assess the effect of each treatment (alone and combined). A double staining method including the propidium iodide (PI) and the 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate was selected to assess membrane integrity and esterase activity in cells, respectively. This protocol was adapted from [16] Kolek et al. (2016). Before staining, 1.5 mL of the different samples (treated and untreated) were centrifuged for 15 minutes at 3266 g. The pellet was resuspended in 4 mL of sterile Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS, 1X, Eurobio Scientific®), and diluted to reach an optical density of  $0.1 \pm 0.05$  (measured at 600 nm, path length 1 cm). The samples were maintained at 4°C until flow cytometry analysis. Aliquots (2 mL) were then stained with 22µM of CFDA (Invitrogen®) and incubated for 30 min at 37°C. 7,5 µM of PI (Invitrogen®) was then added and samples were immediately analysed.

The analysis of stained samples was performed on flow cytometer device thanks to Cytoflex LX® (Beckman Coulter®). The flow cytometer was equipped with blue laser (488 nm, 50 mW). Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) signals were used to trigger and define the total cell population. Green (FL1, B525-FITC; 525/40 BP) and red (FL4, Y585-PE; 585/42 BP) fluorescence were recorded to divide into four quadrants as shown in Figure 2. Data were analysed with the software Kaluza® (Beckman Coulter®). Results are presented as cell proportion calculated by the ratio of bacterial cells unstained (spores) or stained (PI or CFDA) and the total population.

## Results and discussion

### *Evaluation of moderate thermal treatment effects on Clostridium perfringens using flow cytometry*

Heat treatment was performed on DS culture of *C. perfringens* at different stages of cultivation: at the start ( $T_0$ ), after 24 hours ( $T_{24}$ ) and 48 hours ( $T_{48}$ ). A culture without any treatment was carried out in parallel to serve as a control (Figure 2). CFDA/PI staining method was performed on *C. perfringens* samples in order to discriminate the different physiological states of the population and their evolution after heat treatment in moderate temperatures. PI is generally used as an indicator of membrane integrity and stains damaged cells. CFDA is a non-fluorescent dye that penetrates cell envelopes and that is only cleaved by active cells to form green fluorescence. Typical features of dot plots obtained from control and heat-treated samples are shown in Figure 2. In the control, four regions can be distinguished: (R1) PI positive/CFDA negative cells which correspond to dead or altered bacteria; (R2) double stained population dedicated to doublets (Branska 2018); (R3) PI negative/CFDA positive cells which correspond to vegetative active cells and (R4) PI negative/CFDA negative cells. According to [16] Kolek et al., 2016, spores can be enumerated as non-stained cells and thus correspond to this subpopulation.

The treatment applied corresponds to the more commonly process known as pasteurization. This process was chosen because it was reported to lead to a total removal of *Clostridium* vegetative bacteria in complex matrix like sewage sludge or poultry sludge ([18] [19] De los Cobos-Vasconcelos et al., 2015 and Ruiz-Espinosa et al., 2012). The effect of low thermal treatment along time could be evaluated on Figure 2: A2, B2, C2 in comparison with the control culture (Figure 2: A1, B1, C1). As expected, the percentage of spores increases with the time of cultivation in DS medium from 12% at initial time to 49% after 48 hours of cultivation in DS. Moreover when comparing Figure 2: A2 B2 and C2 with the control cultures (Figure 2: A1, B1, C1), the application of heat treatment at 70°C for one hour results in a total elimination of the R3 population (vegetative active cells) and to an increase of proportions of R1 population, corresponding to inactivation and permeabilization of vegetative cells.

The results concerning unstained cells population (assimilated to spores) obtained at initial time ( $T_0$ ) is questionable. Spores seem to be also affected by the treatment as the percentage in R4 region decline from 12% to 3% after heat treatment (Figure A1 and A2). One could thus conclude to a significant effect on spore removal. It seems more probable that unstained population (assimilated to spores) could include not only spores, but also non-active, non-permeabilized, and thus vegetative cells that are eliminated after thermal treatment.

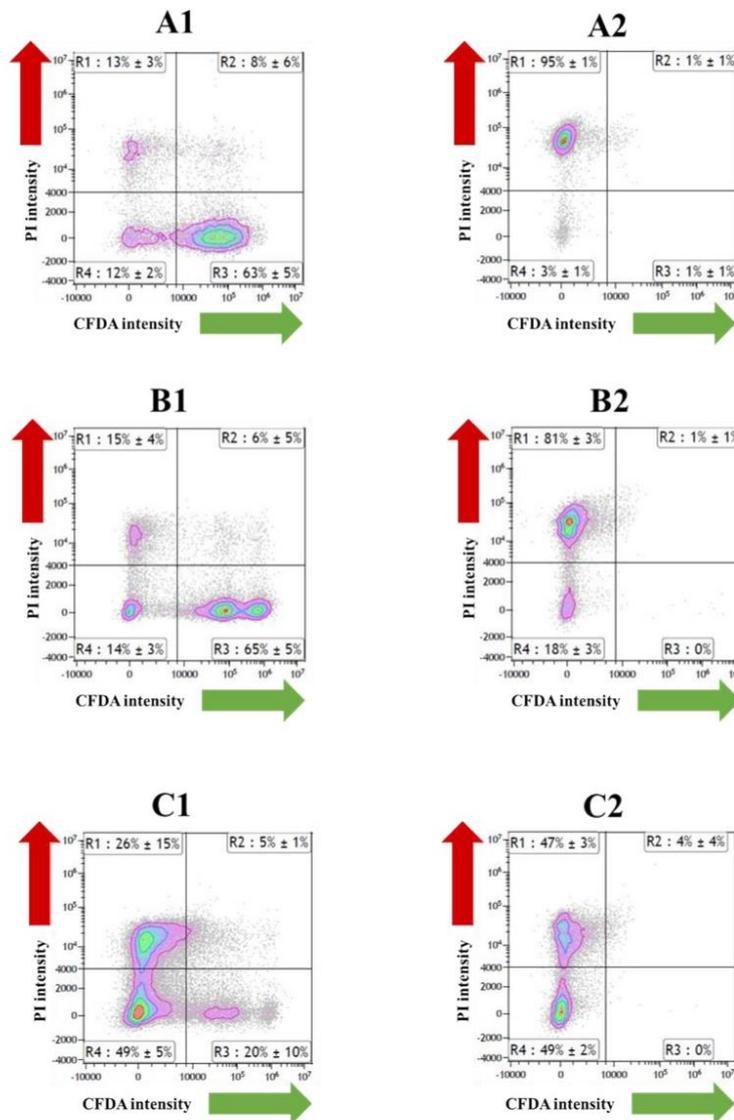


Figure 2: Representative flow cytometer contour density plot from *Clostridium perfringens* population in the control (A) at initial time (T0) (A1), T24 (B1) and T48 (C1) of DS culture and after only moderate thermal treatment (1 hour at 70°C) at T0 (A2), T24 (B2) and T48 (C2) of DS culture. Four regions could be discriminated: dead vegetative cells (R1 region), double stained cells (doublets) (R2 region), active vegetative cells (R3 region) and non stained cells (R4 region)

### Effect of VFA treatment on *Clostridium perfringens*

To investigate VFA treatment on *Clostridium perfringens* in terms of cellular damages and sporulation ability, samples of culture were collected and analysed at three different incubation times ( $T_0$ ,  $T_{24}$  and  $T_{48}$ ) without (control) and after VFA adding. Three different concentrations of VFA addition were implemented 1.5, 3 and 6 g/L, then allowing to compare the effect of increasing concentrations. Thus, the interpretations could be done at two levels: the effect of time incubation for a given concentration and the effect of concentration for a same level of incubation. The different regions of interest R1 (dead or altered bacteria), R3 (vegetative active cells), R4 (assimilated spore cells) are represented in percentage of the whole population to ease the understanding.

At initial time ( $T_0$ ), the repartition of the different forms of *C. perfringens* is quite comparable for the non-treated sample (Figure 3a) and for the treated samples (Figures 3b, c, d) whatever the VFA concentration. There are no noticeable effects. Thus, a long-term effect is waited. That is why, the occurrence of *C. perfringens* in its different forms was investigated along time. In this study, the effect of VFA concentration increase with concentration and time. It also affects the kinetics: the effect on population (vegetative or spore) is correlated to VFA concentration level. For example, after 24 hours in presence of volatile fatty acids, the proportion of active vegetative cells remains constant at 1.5 g/L and comparable both to  $T_0$  and to the control while the proportion of active vegetative cells starts to decline after 24h of incubation since a VFA concentration of 3 g/L. This decrease is accompanied by an increase of the number of permeabilized cells. The results obtained after 48 hours of VFA treatment confirm this trend and even show that a concentration of 1.5 g/L is sufficient to decrease the fraction of active cells. For the maximal VFA concentration (6 g/L) used, all vegetative cells were permeabilized.

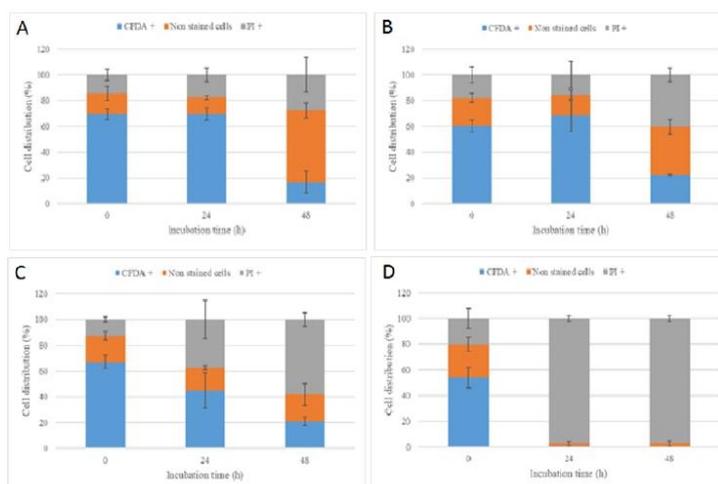


Figure 3. Cell distribution of *Clostridium perfringens* in the sample control (a) and after volatile fatty acids treatment to different concentrations (1.5 g/L (b); 3 g/L (c); 6 g/L(d)) at initial time ( $T_0$ ) and after 24 hours ( $T_{24}$ ) and 48 hours ( $T_{48}$ ) of incubation time.

7

VFA pretreatment has a long-term effect and not an immediate effect as for temperature. This result can be easily explained: volatile fatty acids lead to a cytoplasmic acidification with subsequent uncoupling of energy production and regulation and to an accumulation of the dissociated acid anion to toxic levels ([14] Many Lopez et al. (2012)). This action mechanism could explain the observed effects in this study in terms of membrane integrity lost and also in terms of enzymatic activity of vegetative cells.

The results display drastic damages of *Clostridium perfringens* for the highest VFA concentration (6 g/L) since the percentage of permeabilized cells reach around 95% (Figure 3), suggesting potential sporicidal effects of VFA treatment. Moreover, the results obtained after VFA treatment at 6 g/L during 24 and 48 hours are very close to those obtained just after the heat treatment. It is therefore credible that the decrease of the spore fraction is also explained by an overestimation of the number of spores in the other samples. A fraction of unlabeled "vegetative" cells (and therefore assimilated to spores) could be fully eliminated with a treatment at 6 g/L.

These results demonstrate that VFA treatment can completely eliminate vegetative forms of *Clostridium perfringens*.

The sporulation capacity of *Clostridium perfringens* in presence of volatile fatty acids was especially investigated. The percentage of spores over time ( $T_0$ ,  $T_{24}$  and  $T_{48}$ ) is reported on Figure 4. Sporulation is influenced by increasing VFA concentrations and time incubation.

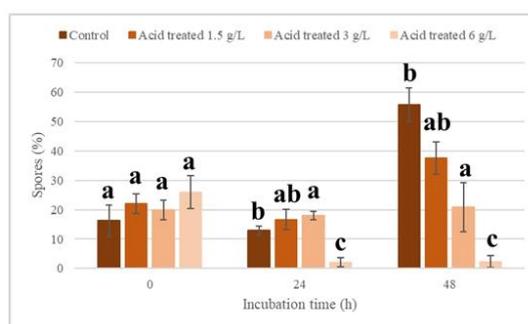


Figure 4. Spores fraction of *Clostridium perfringens* evolution in the control sample and after volatile fatty acids treatment (1.5 g/L; 3 g/L; 6 g/L) over time ( $T_0$ / $T_{24}$ / $T_{48}$ ). Proportion followed by the same letter do not differ statistically among themselves for each treatment by Tukey's test ( $p$ -value < 0.05).

After 48 hours, around 35% of cells are assimilated to spores for a VFA concentration of 1,5 g/L compared to 55% for the control. Figure 4 clearly shows that the spore fraction decreases with increasing VFA concentration. After 48 h of incubation in the sample treated with the highest VFA concentration, the spore fraction represents only 4% compared to 55% for the control. These results can be probably explained by an alteration of vegetative cells in the presence of VFA but also by an inhibition of sporulation associated to a decrease of enzymatic activity. The ability to sporulate is dependent on the capacity of cell to adapt to environmental stresses and different factors are known to be able to modulate sporulation ([21] Gauvry 2017). Among them, pH is a key parameter that could allow to an increase in production of reactive oxygen species (ROS) and could affect the initiation of sporulation.

To confirm this assumption, pH was measured along time in the different samples (Table 1). Although the pH was never below 5 in this study (Table 1), its decrease after the addition of VFA probably explains our results. Furthermore, it was previously demonstrated that the reduction of cytoplasmic pH is more effective with acidification by organic rather than inorganic acids. VFA are more efficient to permeate the cell membrane ([10] Ross 2003). The pH in the samples has to be seriously considered in the context of further anaerobic digestion implementation. An optimal VFA concentration has to be found to obtain a compromise between bacterial and spore removal efficiency and compatible pH for anaerobic digestion.

Table 1. Average pH of samples after VFA treatment.

pH	Control medium	VFA-added medium (1.5 g/L)	VFA-added medium (3 g/L)	VFA-added medium (6 g/L)
T <sub>0</sub>	7.57 ± 0.4	7.05 ± 0.1	6.54 ± 0.1	5.2 ± 0
T <sub>24</sub>	7.52 ± 0.3	7.07 ± 0.1	6.54 ± 0	5.2 ± 0
T <sub>48</sub>	7.56 ± 0.4	7.05 ± 0.1	6.53 ± 0	5.19 ± 0

#### *Effects of combined VFA /moderate heat treatment on Clostridium perfringens*

According to the above results, low thermal treatment is rapidly efficient on vegetative cell and VFA pre-treatment is interesting when used on a long term, both to remove vegetative cells and to prevent spore formation. The combination of the two treatments can allow to couple the advantages of each treatment. The possibility of additional lethal effects by the combination of VFA adding and thermal treatment on *Clostridium perfringens* was investigated. The results are represented on Figure 5.

At initial time (T<sub>0</sub>), as expected, all vegetative active cells have been inactivated since all samples only contain permeabilized cells and spores whatever the VFA concentration added in the culture. These results are very closed to those obtained after only moderate heat treatment (Figure 2). This effect, due to thermal treatment, is not affected by VFA adding.

The Figure 5 allows to evaluate the effect of the coupling of the 2 treatments. As previously observed, spore population decrease when VFA concentration increased. These observations are even clear after 48 hours of sporulation culture since spores only represents around 4% of cell population for the maximal VFA concentration added (6 g/L) compared to 57% of spores in the control (only after heating).

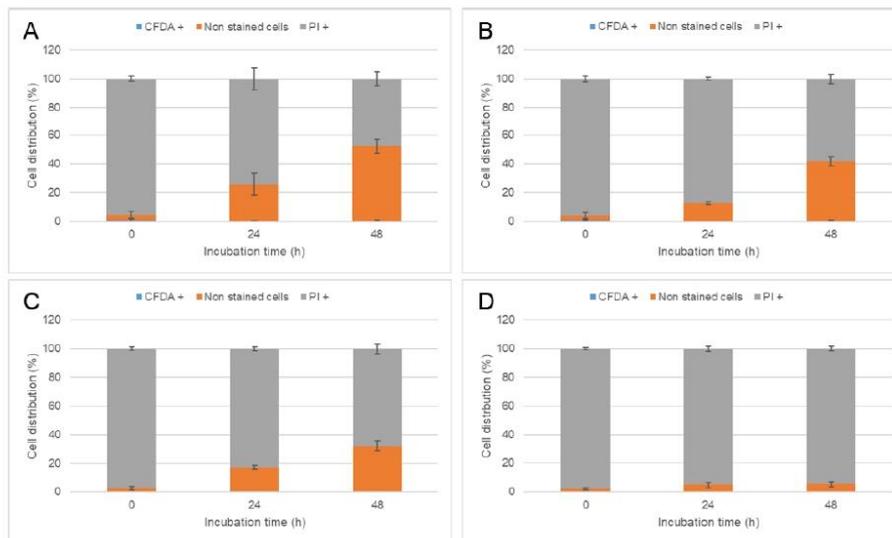


Figure 5 : Cell distribution of *Clostridium perfringens* after heat treatment (70°C during 1 hour) of the DS culture sample (control) (a) and after volatile fatty acids treatment to different concentrations (1.5 g/L (b); 3 g/L (c); 6 g/L (d)) at initial time (T<sub>0</sub>) and after 24 hours (T<sub>24</sub>) and 48 hours (T<sub>48</sub>) of incubation time.

These results confirm the previous observations and are probably explained by an inhibition of sporulation depending on the VFA concentrations applied. This sporulation limitation is all the stronger as the concentration of AGV is high. Vegetative cells that have become unable to sporulate as a consequence of VFA presence are altered by subsequent heat treatment. Thus, these results show clearly additional and complementary effects of the combined treatment: (1) VFA addition depending on applied concentration allow to sporulation inhibition while (2) moderate heat treatment led to vegetative forms destruction.

If sporicidal effects were not directly assessed in this study, they cannot be excluded. Given the action mechanism of volatile fatty acids and thermal treatment, it seems reasonable to hypothesis that such treatments might also contribute to spore structure alteration as both have been described to induce membrane damages ([14] Many Lopez 2012). In a review, [9] Setlow (2006) reported that a treatment of spores of *Bacillus subtilis* with acid or ethanol induced a significant breakdown of the spore's permeability barriers. To a better understanding of spore structure damages induced by such combined treatment, Scanning and/or Transmission Electron Microscopy (SEM and/or TEM) could allow an access of morphological changes after treatment ([22] [23] [24] [6] Lv 2019 2020, Luong 2020, El Jaam 2017). Moreover, in this study, a double staining CFDA/PI was used to assess the consequences of VFA/ thermal treatment of *Clostridium perfringens* in terms of viability and sporulation capacities ([16] [20] Kolek 2016 and Branska 2018). But recent studies have reported the interest of PI/Syto 16 fluorescent stains to discriminate different degrees of injury of the membrane of spores submitted to various treatments, alone or combined ([8] [24] [22] [23] [25] Borch 2017, Luong 2020, Lv 2019 2020, Fan 2019). It could therefore be relevant to evaluate the sporicidal properties of this combined treatment using this double staining.

Finally, due to the drastic damages observed on *Clostridium perfringens* in this study, it can be supposed that the capacity of germination of treated spores could be altered and their outgrowth ability limited ([26] Mtimet 2017).

### **Conclusion**

The possibility of combining two or more technologies in order to reduce energy input while maintaining high pathogens removal have to be considered in anaerobic digestion treatment plant.

In this study, we have investigated the possibility to enhance the lethal effects of thermal treatment in moderate conditions on *Clostridium perfringens* by VFA adding. This work leads to significant conclusions by showing that VFA allow to sporulation inhibition while thermal treatment inactive all vegetative cells. This combined treatment could be an useful option for anaerobic digestion pre-treatment to limit the presence of *Clostridium perfringens* in digestate.

Whereas the conclusions listed above can be drawn, further validation on other strains of *Clostridium perfringens* should be considered. Potential sporicidal effects should be also investigated. Finally, an optimal VFA concentration has to be found to obtain a compromise between bacterial and spore removal efficiency and compatible pH for anaerobic digestion.

## Bibliography

- [1] E. Bagge, L. Sahlström, A. Albiñ, The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants, *Water Research*. 39 (2005) 4879–4886. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.016>.
- [2] C. Le Maréchal, C. Druilhe, E. Repérant, E. Boscher, S. Rouxel, S. Le Roux, T. Poézévara, C. Ziebal, C. Houdayer, B. Nagard, F. Barbut, A. Pourcher, M. Denis, Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants, *MicrobiologyOpen*. 8 (2019). <https://doi.org/10.1002/mbo3.872>.
- [3] B. Lüdecke, M. Nelles, R. Dibbert, Anaerobic treated organic waste - Effects of sanitation regarding to pathogenic clostridia, *Biomass and Bioenergy*. 141 (2020) 105709. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105709>.
- [4] X. Liu, T. Lendormi, J.-L. Lanoisellé, Overview of hygienization pretreatment for pasteurization and methane potential enhancement of biowaste: Challenges, state of the art and alternative technologies, *Journal of Cleaner Production*. 236 (2019) 117525. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.356>.
- [5] O. El Jaam, I. Fliss, M. Aider, Application of electro-activated potassium acetate and potassium citrate solutions combined with moderate heat treatment on the inactivation of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 33 (2016) 483–488. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.021>.
- [6] O. El Jaam, I. Fliss, M. Aïder, Effect of electro-activated aqueous solutions, nisin and moderate heat treatment on the inactivation of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores in green beans puree and whole green beans, *Anaerobe*. 47 (2017) 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.017>.
- [7] J.-H. Mah, D.-H. Kang, J. Tang, Morphological Study of Heat-Sensitive and Heat-Resistant Spores of *Clostridium sporogenes*, Using Transmission Electron Microscopy, *Journal of Food Protection*. 71 (2008) 953–958. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.5.953>.
- [8] K. Borch-Pedersen, H. Mellegård, K. Reineke, P. Boysen, R. Sevenich, T. Lindbäck, M. Aspholm, Effects of High Pressure on *Bacillus licheniformis* Spore Germination and Inactivation, *Applied and Environmental Microbiology*. 83 (2017) 13. <https://doi.org/10.1128/AEM.00503-17>.
- [9] P. Setlow, Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals, *J Appl Microbiol*. 101 (2006) 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>.
- [10] A.I.V. Ross, M.W. Griffiths, G.S. Mittal, H.C. Deeth, Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*. 89 (2003) 125–138. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00161-2).
- [11] J. Bauza-Kaszewska, Z. Paluszak, A.J. Keutgen, Effect of formic acid and heat treatment on *Clostridium sporogenes* spores inactivation in animal by-products, *Med. Weter.* (2014) 5.

- [12] H.R. Salsali, W.J. Parker, S.A. Sattar, Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion, *Can. J. Microbiol.* 52 (2006) 279–286. <https://doi.org/10.1139/w05-125>.
- [13] H. Salsali, W.J. Parker, S.A. Sattar, The effect of volatile fatty acids on the inactivation of *Clostridium perfringens* in anaerobic digestion, *World J Microbiol Biotechnol.* 24 (2008) 659–665. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9514-4>.
- [14] E. Mani-López, H.S. García, A. López-Malo, Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products, *Food Research International.* 45 (2012) 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.
- [15] J. Ganguly, M. Tempelaars, T. Abee, R. van Kranenburg, Characterization of sporulation dynamics of *Pseudoclostridium thermosuccinogenes* using flow cytometry, *Anaerobe.* 63 (2020) 102208. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102208>.
- [16] J. Kolek, B. Branska, M. Drahokoupil, P. Patakova, K. Melzoch, Evaluation of viability, metabolic activity and spore quantity in clostridial cultures during ABE fermentation, *FEMS Microbiology Letters.* 363 (2016) fnw031. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw031>.
- [17] Beckman Coulter, CytoFLEX, CytoFLEX S, and CytoFLEX LX Flow Cytometers For Research Use Only., (2019).
- [18] D. De los Cobos-Vasconcelos, M.E. Villalba-Pastrana, A. Noyola, Effective pathogen removal by low temperature thermal pre-treatment and anaerobic digestion for Class A biosolids production from sewage sludge, *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development.* 5 (2015) 56–63. <https://doi.org/10.2166/washdev.2014.036>.
- [19] J.E. Ruiz-Espinoza, J.M. Méndez-Contreras, A. Alvarado-Lassman, S.A. Martínez-Delgado, Effect of low temperature thermal pre-treatment on the solubilization of organic matter, pathogen inactivation and mesophilic anaerobic digestion of poultry sludge, *Journal of Environmental Science and Health, Part A.* 47 (2012) 1795–1802. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.689237>.
- [20] B. Branska, Z. Pechacova, J. Kolek, M. Vasylykivska, P. Patakova, Flow cytometry analysis of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 populations exhibiting different phenotypes induced by changes in cultivation conditions, *Biotechnol Biofuels.* 11 (2018) 99. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1096-x>.
- [21] E. Gauvry, A.-G. Mathot, I. Leguérinel, O. Couvert, F. Postollec, V. Broussolle, L. Coroller, Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment, *Research in Microbiology.* 168 (2017) 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>.
- [22] R. Lv, M. Zou, T. Chantapakul, W. Chen, A.I. Muhammad, J. Zhou, T. Ding, X. Ye, D. Liu, Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores, *Appl Microbiol Biotechnol.* 103 (2019) 2329–2338. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9559-3>.
- [23] R. Lv, A.I. Muhammad, M. Zou, Y. Yu, L. Fan, J. Zhou, T. Ding, X. Ye, M. Guo, D. Liu, Hurdle enhancement of acidic electrolyzed water antimicrobial efficacy on *Bacillus cereus* spores using ultrasonication, *Appl Microbiol Biotechnol.* 104 (2020) 4505–4513. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10393-6>.
- [24] T.S.V. Luong, C. Moir, P.S. Chandry, T. Pinfold, S. Olivier, V. Broussolle, J.P. Bowman, Combined high pressure and heat treatment effectively disintegrates spore

membranes and inactivates Alicyclobacillus acidoterrestris spores in acidic fruit juice beverage, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 66 (2020) 102523. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102523>.

[25] L. Fan, F. Hou, A.I. Muhammad, L.V. Ruiling, R.B. Watharkar, M. Guo, T. Ding, D. Liu, Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores, *Food Research International*. 116 (2019) 1094–1102. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.052>.

[26] N. Mtimet, C. Trunet, A.-G. Mathot, L. Venaille, I. Leguérinel, L. Coroller, O. Couvert, Walking dead: Permeabilization of heat-treated *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 spores under growth-preventing conditions, *Food Microbiology*. 64 (2017) 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.013>.

### III.2.3. Conclusion

Le traitement thermique appliqué sur une culture pure de *Clostridium perfringens* a permis de montrer que ce dernier entraînait un abattement total de la concentration des formes végétatives. Cependant, le traitement thermique n'exerçait aucune influence sur les formes sporulées de cette bactérie.

Concernant les traitements acides à des concentrations de 1,5 et 3 g/L, ces derniers ont montré des effets après 48 heures de traitement : la proportion de formes perméabilisées est supérieure à celle observée dans le témoin. De plus, la proportion de formes ayant une activité enzymatique est inférieure à celle du témoin. Il y aurait donc une perte d'intégrité membranaire des formes végétatives associées à une forte diminution de l'activité enzymatique suite à l'application de ces traitements acides. L'effet est encore plus marqué lorsque la concentration en acides est de 6 g/L. L'augmentation de la proportion de formes IP+ est observable dès T<sub>24</sub>. Après 48 heures de traitement, la proportion des formes perméabilisées est supérieure à 95%.

L'évolution de la proportion des formes non marquées est aussi différente en fonction du traitement acide appliqué. Un ralentissement du processus de sporulation est observé car la proportion de formes non marquées augmente plus lentement au cours du temps dans les échantillons acides que dans l'échantillon témoin.

La combinaison des traitements acide et thermique a montré des effets additifs sur les différentes populations de *Clostridium perfringens* : la destruction des formes végétatives associée à un ralentissement voire une inhibition de la sporulation avec un effet dose-dépendant (effets plus importants à 6 g/L qu'à 1,5 g/L).

Ce chapitre a permis de montrer que des traitements modérés pourraient agir sur les différentes formes bactériennes de *Clostridium perfringens* (Tableau 34). Cette étude des effets par cytométrie en flux a montré que cette bactérie sporulante était ainsi sensibilisée par la combinaison de traitements acide et thermique.

Tableau 34. Effets des traitements thermique, acides et acido-thermiques sur les formes végétatives et sporulées de *Clostridium perfringens*.

	Traitement thermique	Traitements acides	Traitements acido-thermiques
Formes végétatives	Abattement total	Abattement dose-dépendant	Abattement total
Formes sporulées	Aucun effet	Ralentissement du processus de sporulation (dose-dépendant)	Ralentissement du processus de sporulation (dose-dépendant)

### III.3. Application des pré-traitements sur une culture pure de *Clostridium perfringens* : analyse des effets par imagerie en flux

La caractérisation des effets du traitement thermique couplé à l'ajout d'AGV sur *Clostridium perfringens* par CMF a permis de comprendre, en partie, les effets de ce couplage. Les AGV permettent une inhibition de la sporulation tandis que le traitement thermique génère une inactivation des cellules végétatives. On peut alors parler de traitement par effet additif. Un double marquage CFDA/IP a permis de renseigner sur l'évolution physiologique des cellules en termes de perméabilité membranaire et d'activité enzymatique en réponse aux différents traitements appliqués.

Si la CMF a permis de renseigner sur l'évolution physiologique des différentes populations, la possibilité d'accéder à des paramètres morphologiques constitue un élément clé de la compréhension des mécanismes. Toutefois, la CMF n'a pas vocation à générer des informations précises sur les paramètres morphologiques des cellules analysées puisque celles-ci restent limitées à la taille et la granulosité. Or, dans le cycle de vie des bactéries de type *Clostridium*, les questions relatives à la morphologie des différentes populations dans le cycle de sporulation pourrait apporter des éclairages complémentaires aux observations physiologiques mises en évidence par CMF (cf Figure 17).

L'analyse morphologique des échantillons par analyse d'images va être rendue complexe par la multiplicité des formes de cette bactérie au cours de son cycle de sporulation. Cependant, on retiendra que les formes sporulées peuvent être géométriquement associées à des sphères, tandis que les formes végétatives ont une forme de bâtonnets.

L'objectif de cette partie III.3 des résultats est d'apporter quelques éléments de réponse sur ces derniers points en utilisant la technique d'imagerie en flux.

L'imagerie en flux (IMF) a été utilisée en complément de la CMF lors de ce travail. Cette technique est la combinaison de la cytométrie en flux (les marqueurs utilisés sont ceux utilisés au chapitre III.2 et d'imagerie photonique permettant l'acquisition d'images bactériennes en temps réel passant devant les lasers. Ainsi, les données obtenues par imagerie en flux vont permettre :

- 1) Dans une première partie, d'obtenir la stratégie globale d'analyse des données ainsi que leur application à l'étude des formes végétatives et sporulées de *Clostridium perfringens*.
- 2) Dans une deuxième partie, de caractériser les effets d'un traitement combiné AGV/thermique sur *Clostridium perfringens*.

### III.3.1. Etude d'une culture pure de *Clostridium perfringens* par imagerie en flux (IMF)

Les étapes de l'analyse des données recueillies par IMF sont détaillées ci-après. En effet, il a été nécessaire de mettre au point une méthodologie rigoureuse d'analyse des images obtenues sur des cultures non traitées, afin de pouvoir ensuite proposer des éléments d'interprétation d'images résultants de cultures traitées.

#### III.3.1.1. Principe général de l'IMF

L'imagerie en flux combine les propriétés de la cytométrie en flux avec des données telles que décrites dans le chapitre III.2, en utilisant des marqueurs fluorescents relatifs aux propriétés physiologiques des cellules (intégrité membranaire, activité enzymatique), et de l'imagerie photonique permettant d'obtenir des données morphologiques *via* des images en deux dimensions de ces mêmes cellules. Le principe d'analyse suit la même méthodologie que celui de la cytométrie en flux et est détaillé dans la partie matériel et méthodes (chapitre II.2.3.3).

##### III.3.1.1.1. Traitement des données : Stratégie de « gating »

Le traitement des données est réalisé après acquisition de tous les échantillons. L'objectif du traitement des données par la stratégie du « gating » est de mettre en évidence les différentes populations d'intérêt.

Dans ce travail, la mise en place de la stratégie de « gating » a été réalisée à partir d'un échantillon de *Clostridium perfringens* issu d'une culture de 48h en milieu Duncan Strong afin d'avoir une population hétérogène comportant des formes végétatives ainsi que des spores. Avant passage en IMF, les cellules ont préalablement été marquées à l'IP et au CFDA comme indiqué dans la partie matériel et méthodes (chapitre II.2.3.1).

L'intérêt de l'analyse *a posteriori* des données d'imagerie en flux par le logiciel IDEAS® réside principalement dans le choix des paramètres que l'on souhaite restituer en fonction de ce que l'on veut montrer. Ici le « gating » (ou sélection de ces paramètres) est indispensable compte tenu du choix particulièrement élevé de mode de restitution des informations par le logiciel.

Une spécificité importante du logiciel est l'analyse précise des images une à une :

- la sélection d'une image permet la localisation exacte de son point sur les différents graphiques afférents à l'étude ;
- réciproquement, la sélection d'un point sur un graphique le localise sur les autres et affiche en même temps la photographie correspondante.

Les doublets de bactéries, le bruit de fond, ainsi que les artefacts d'analyse sont éliminés par une stratégie de « gating » successifs consistant en une ou plusieurs sélections sur l'ensemble des objets analysés. Les différentes étapes sont illustrées dans la figure 44.

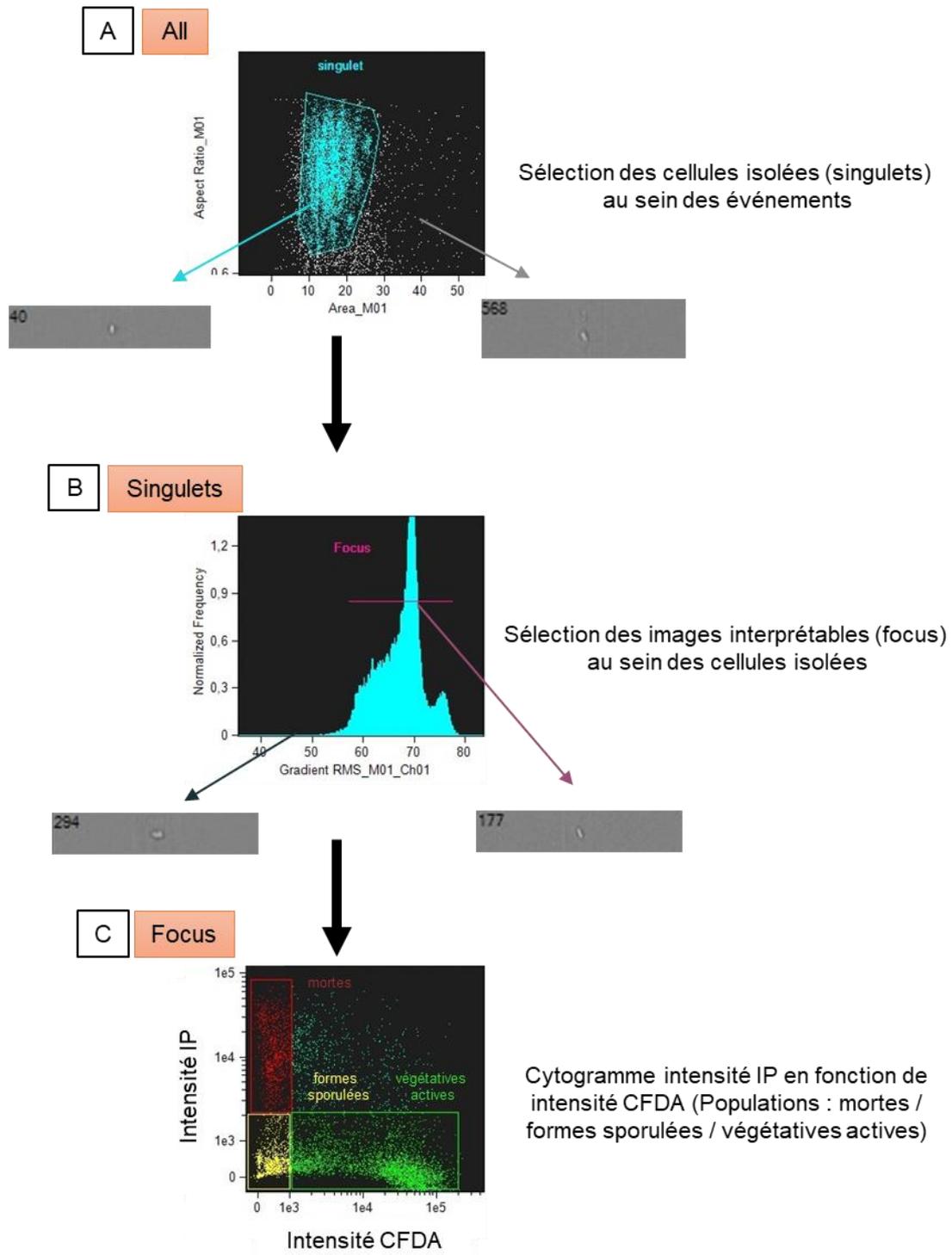


Figure 44. Stratégie de sélection des populations d'intérêt.

La première étape consiste en la sélection des cellules isolées. Pour cela, un « dot plot » « Area versus Aspect ratio » est tracé (Figure 44A). Plus l'aspect ratio est proche de un, plus la probabilité d'avoir une bactérie isolée est importante car l'aspect ratio est le rapport de la longueur sur la largeur. A l'inverse en dessous de 0,6 - 0,7, il ne s'agit quasiment exclusivement que de doublets ou artefacts d'analyse. Concernant le paramètre « area », une aire supérieure à 25  $\mu\text{m}^2$  correspond souvent à des triplets.

A partir des singulets ainsi sélectionnés, les images floues sont éliminées en utilisant le paramètre « gradient RMS ». Ce dernier mesure les fortes variations de valeurs de pixels voisins dans une image. Plus ce gradient est important, plus l'image de l'objet correspondant est nette. Un focus des images interprétables est donc réalisé à partir de l'histogramme « gradient RMS » (Figure 44B).

Un double marquage des cellules avec de l'IP et du CFDA a été réalisé préalablement à l'analyse par IMF. A partir de ces sélections successives (Figure 44), un cytogramme représentant l'intensité de fluorescence rouge (canal 4) en fonction de l'intensité de fluorescence verte (canal 2) est établi (Figure 44C). Le type de cytogramme obtenu est très semblable à ce qu'on peut obtenir par cytométrie en flux (Figure 45).

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence 4 états physiologiques :

- un état « intermédiaire » des cellules doublement positives (CFDA+ IP+) : cela correspond vraisemblablement à un état physiologique transitoire. Cette population ne sera pas prise en compte dans la suite des résultats ;
- un état des cellules végétatives perméabilisées (IP+ CFDA-) correspondant à des bactéries mortes ;
- un état des cellules non perméabilisées actives (IP- CFDA+) assimilée à des formes végétatives actives ;
- un état « formes sporulées » : les cellules sont non marquées (IP- CFDA-). Elles comprennent les spores à l'intérieur desquelles les fluorochromes ne peuvent pénétrer. Dans la suite de ce manuscrit, le terme « formes sporulées » sera attribué aux cellules appartenant à cette région.

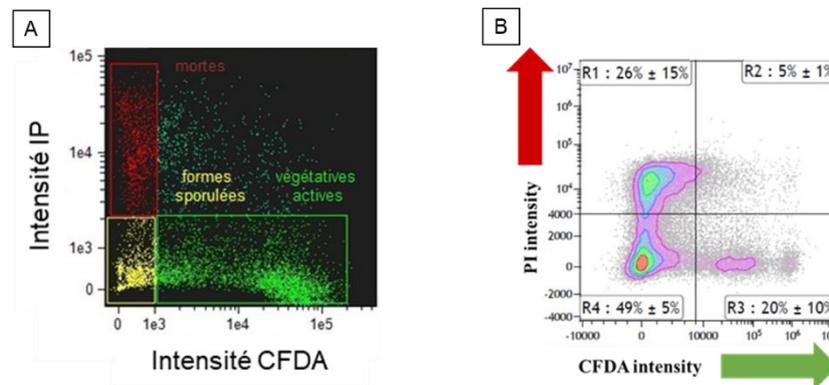


Figure 45. Cytogrammes d'un échantillon de *Clostridium perfringens* issu d'une culture de 48h en milieu Duncan Strong obtenus après analyse par imagerie en flux (Figure 45A) et par cytométrie en flux (Figure 45B).

La stratégie de « gating » mise en œuvre dans cette thèse a permis d'obtenir, par imagerie en flux, des cytogrammes identiques à ceux obtenus par cytométrie en flux (Figure 45). Grâce à cette différenciation morphologique des populations en présence, une nouvelle différenciation (rendue possible par l'imagerie en flux) au sein de ces populations peut être établie. On utilisera le terme de « sous-population » pour définir les différentes bactéries analysées au sein de ces populations.

### III.3.1.1.2. Sélection des paramètres morphologiques d'intérêt

L'imagerie en flux, combinée à une analyse des données par IDEAS®, permet d'accéder à différents paramètres morphologiques cellulaires des populations d'intérêt, ce que la CMF ne permet pas. L'objectif est de sélectionner les paramètres morphologiques d'intérêt afin de différencier les formes arrondies (spores) des formes allongées (végétatives) au sein d'un échantillon grâce à l'utilisation de l'IMF combinée au logiciel d'analyse.

Plusieurs paramètres ont été testés afin d'identifier les plus discriminants (Tableau 35). Ce caractère discriminant est évalué à partir de la capacité du paramètre morphologique considéré à mettre en évidence des différences remarquables au sein d'une population présentant des propriétés de fluorescence identiques. La recherche de ces paramètres a été effectuée sur 2 populations d'intérêt susceptibles d'évoluer au cours de la sporulation : la région correspondante aux cellules végétatives enzymatiquement actives et la population assimilée aux formes sporulées.

Le paramètre « longueur » mesure la partie la plus longue de la cellule traversant l'imageur en flux (Figure 46A). Le paramètre « largeur », souvent combiné avec le paramètre « hauteur » (Figure 46B), permettrait de connaître l'élongation de la cellule. Le « rapport de forme » correspond à l'épaisseur minimale de la cellule divisée par la longueur (Figure 46A). Le paramètre « circularité » (Figure 46C) mesure le degré de déviation de la cellule par rapport à un cercle. Cette mesure est basée sur le rayon moyen  $d$  de la cellule divisée par la variation de cette distance.

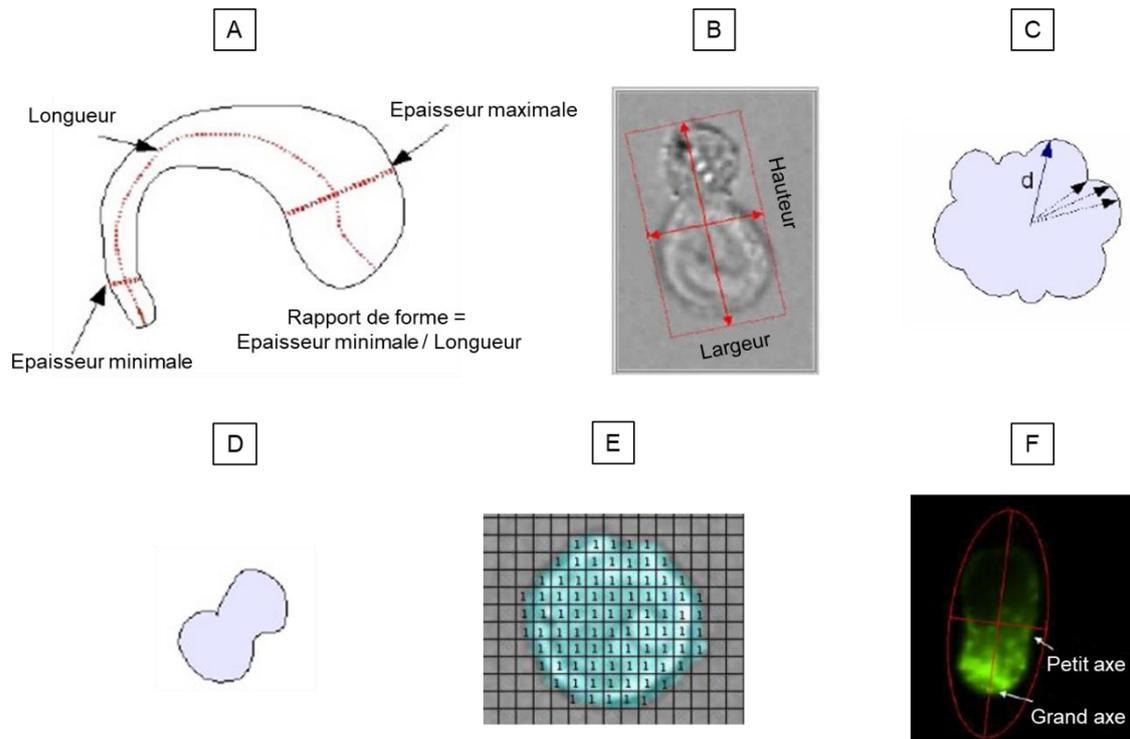


Figure 46. Paramètres morphologiques analysés avec le logiciel IDEAS® (175).

Figure 46A : longueur et rapport de forme

Figure 46B : hauteur et largeur

Figure 46C : circularité

Figure 46D : symétrie

Figure 46E : aire

Figure 46F : « aspect ratio intensity ».

D'après nos expérimentations, tous les paramètres énoncés ci-dessus ne permettraient pas de discriminer les sous-populations au sein des populations « formes sporulées » et « végétatives actives » de *Clostridium perfringens* (matérialisé par un – dans le Tableau 35). D'autres paramètres morphologiques ont été testés (Tableau 35) et permettraient de discriminer les bactéries aux propriétés de fluorescence identiques (matérialisé par un + dans le Tableau 35). Ces paramètres sont la « symétrie », « l'aire » et « l'aspect ratio intensity ».

La « symétrie » mesure la tendance de la cellule à avoir un axe unique d'allongement (Figure 46D). Le paramètre « aire » est calculé par le logiciel en considérant qu'un pixel correspond à une surface de  $0,25 \mu\text{m}^2$  (Figure 46E). Le paramètre « aspect ratio intensity » correspond au rapport de l'axe le plus long de la bactérie sur l'axe le plus court de celle-ci au sein du canal d'intensité considéré (Figure 46F).

Tableau 35. Les différents paramètres morphologiques analysés avec le logiciel IDEAS® pour la recherche d'un caractère discriminant au sein d'une population.

Paramètres morphologiques	Longueur	Largeur	Rapport de forme	Hauteur	Circularité	Aire	« Aspect ratio intensity »	Symétrie
Caractère discriminant Population « formes sporulées »	-	-	-	-	-	-	-	+
Caractère discriminant Population « végétatives actives »	-	-	-	-	-	+	+	-

- **Caractère discriminant pour les formes sporulées**

Concernant la région non marquée (CFDA- IP-), un histogramme avec le paramètre « symétrie » a permis d'établir des différences morphologiques entre les cellules présentes dans cette région correspondant à l'état « formes sporulées » (Figure 47). Ce paramètre « symétrie » mesure la tendance de la cellule à avoir un axe unique d'allongement. Dans le cadre nos travaux, toutes les formes inférieures à 20 pixels pourraient être considérées comme des formes bactériennes arrondies et celles supérieures à 20 pixels comme des formes plus allongées de type « bâtonnets ».

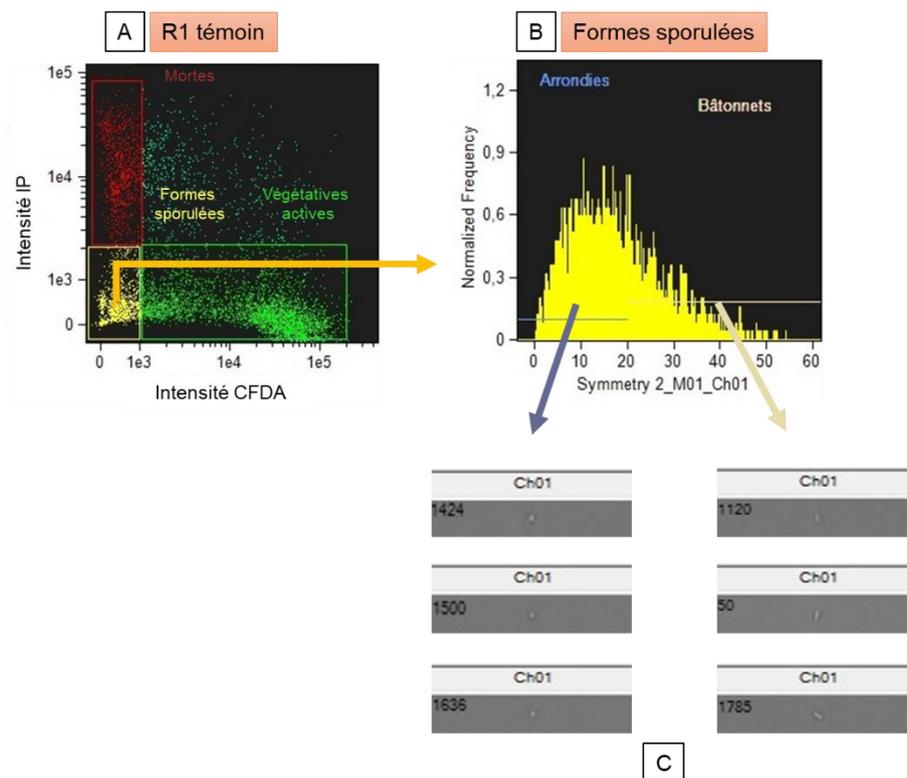


Figure 47. Identification des sous-populations d'intérêt au sein des formes sporulées (doubles négatives) de *Clostridium perfringens*.

Figure 47A : cytogramme représentant la fluorescence rouge (IP) en fonction de la fluorescence verte (CFDA) d'un échantillon témoin.

Figure 47B : histogramme obtenu à partir du paramètre « symétrie » permettant la discrimination des formes sporulées « arrondies » et « bâtonnets » d'un échantillon témoin.

Figure 47C : images des formes arrondies et bâtonnets obtenues par l'imageur en flux au sein des formes doubles négatives d'un échantillon témoin.

Ces résultats sembleraient donc indiquer la présence de cellules dans un état physiologique différent au sein de la population non marquée :

- les cellules arrondies sembleraient correspondre à des spores ;
- les cellules plus allongées en forme de bâtonnet pourraient correspondre à des cellules végétatives non perméabilisées (IP-) et non actives (CFDA-) et/ou à des cellules en dernier stade de sporulation.

## - Caractères discriminants pour les cellules végétatives actives

Concernant les formes bactériennes actives (CFDA+ IP-), la combinaison de « l'aspect ratio intensity » en fonction de « l'aire » a été considérée comme un paramètre potentiellement discriminant au sein de la population « végétatives actives ».

En effet, le paramètre « aire » est calculé par le logiciel en considérant qu'un pixel correspond à une surface de  $0,25 \mu\text{m}^2$ . Quant au paramètre « aspect ratio intensity », il correspond au rapport de l'axe le plus long de la bactérie sur l'axe le plus court de celle-ci au sein du canal d'intensité du CFDA (canal 2). D'après nos expérimentations, cette combinaison mettrait en évidence 3 sous-populations bactériennes avec des caractéristiques morphologiques différentes correspondant probablement à des niveaux différents du cycle de sporulation (Figure 48). Toutes les formes bactériennes comprises entre 1 et 0,8 seraient des formes arrondies. Les bactéries comprises entre 0,8 et 0,5 seraient de courts bâtonnets. Enfin, les formes inférieures à 0,5 seraient de longs bâtonnets.

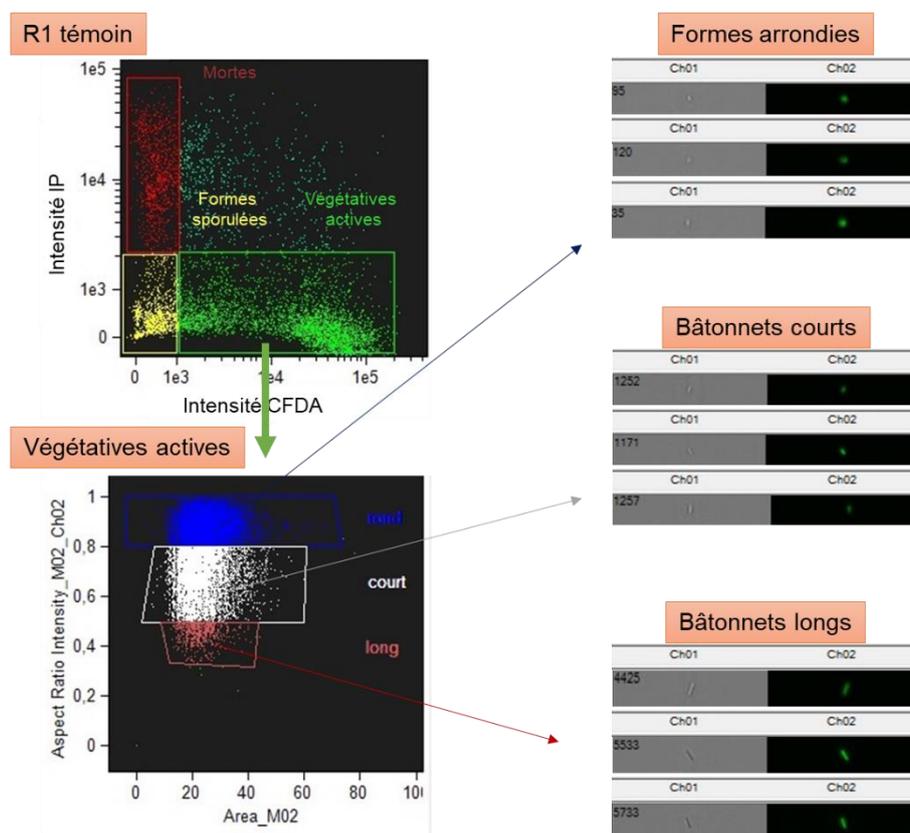


Figure 48. Analyse morphologique des cellules au sein de la population « végétatives actives » (vivantes) de *Clostridium perfringens*.

Ces résultats conduisent à la mise en évidence de morphologies différentes au sein d'une population présentant des propriétés de fluorescence similaires. Ces résultats démontreraient la valeur ajoutée de l'imagerie en flux par rapport à la cytométrie en flux. Il est vraisemblable que ces différences morphologiques correspondraient à différents stades de sporulation.

### III.3.1.2. Evolution des différentes sous-populations au cours de la sporulation

Grâce au protocole développé et décrit précédemment, l'objectif, dans cette partie, est d'identifier si ce protocole d'analyse est adapté au suivi d'une culture de *Clostridium perfringens* en cours de sporulation. L'analyse présentée dans ce mémoire s'est particulièrement concentrée sur les populations en cours de sporulation puisque ce sont elles qui posent le plus de problèmes. Pour cela, des cellules issues d'un milieu TSB, essentiellement sous formes végétatives, ont été placées dans un milieu de sporulation (DS). Les populations bactériennes sont analysées initialement ( $T_0$ ), après 24 heures ( $T_{24}$ ) et après 48 heures ( $T_{48}$ ) de culture dans ce milieu. Après double marquage CFDA/IP des échantillons et analyses par IMF, le suivi a été centré sur 2 populations d'intérêt susceptibles d'évoluer au cours de la sporulation : la région correspondant aux cellules végétatives présentant une activité enzymatique (fluorescence verte) (Figure 49) et la région correspondant aux formes sporulées (non fluorescentes) (Figure 50).

#### III.3.1.2.1. Evolution de la sporulation au sein de la zone « formes végétatives actives »

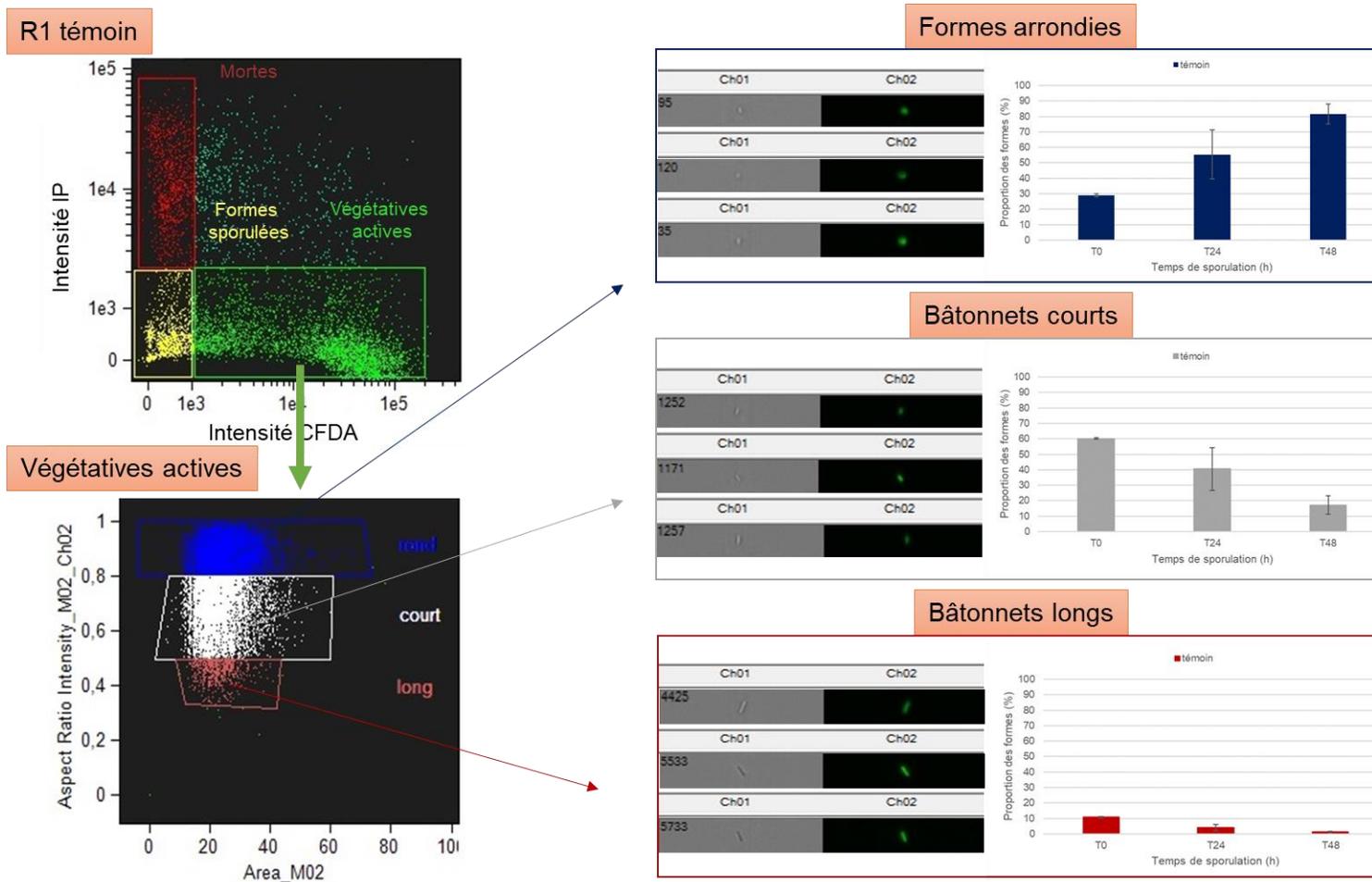


Figure 49. Evolution de la morphologie des cellules végétatives actives (vivantes) de *Clostridium perfringens* au cours de la sporulation.



Les résultats obtenus mettent clairement en évidence une évolution morphologique de la population végétative active placée dans des conditions propices de sporulation (Figure 49).

Les formes « bâtonnets courts », qui représentent environ 60% de la population végétative active initialement ( $T_0$ ) deviennent minoritaires après 48 heures dans le milieu de sporulation et ne représentent plus que 17%. Les résultats obtenus avec les « bâtonnets longs » suivent la même tendance. Ces derniers ne représentent plus qu'un infime pourcentage en fin de sporulation (1% environ à  $T_{48}$ ).

Au contraire, les formes arrondies augmentent significativement au cours de la sporulation et deviennent majoritaires en fin de culture (passage de 29% à  $T_0$  à 82% à  $T_{48}$ ).

Au cours du temps, on observe bien que l'incubation de la culture de *Clostridium perfringens* dans un milieu favorable à la sporulation conduit à un pourcentage très élevé de formes rondes et très faibles de formes bâtonnets.



### III.3.1.2.2. Evolution de la sporulation au sein de la zone « formes sporulées »

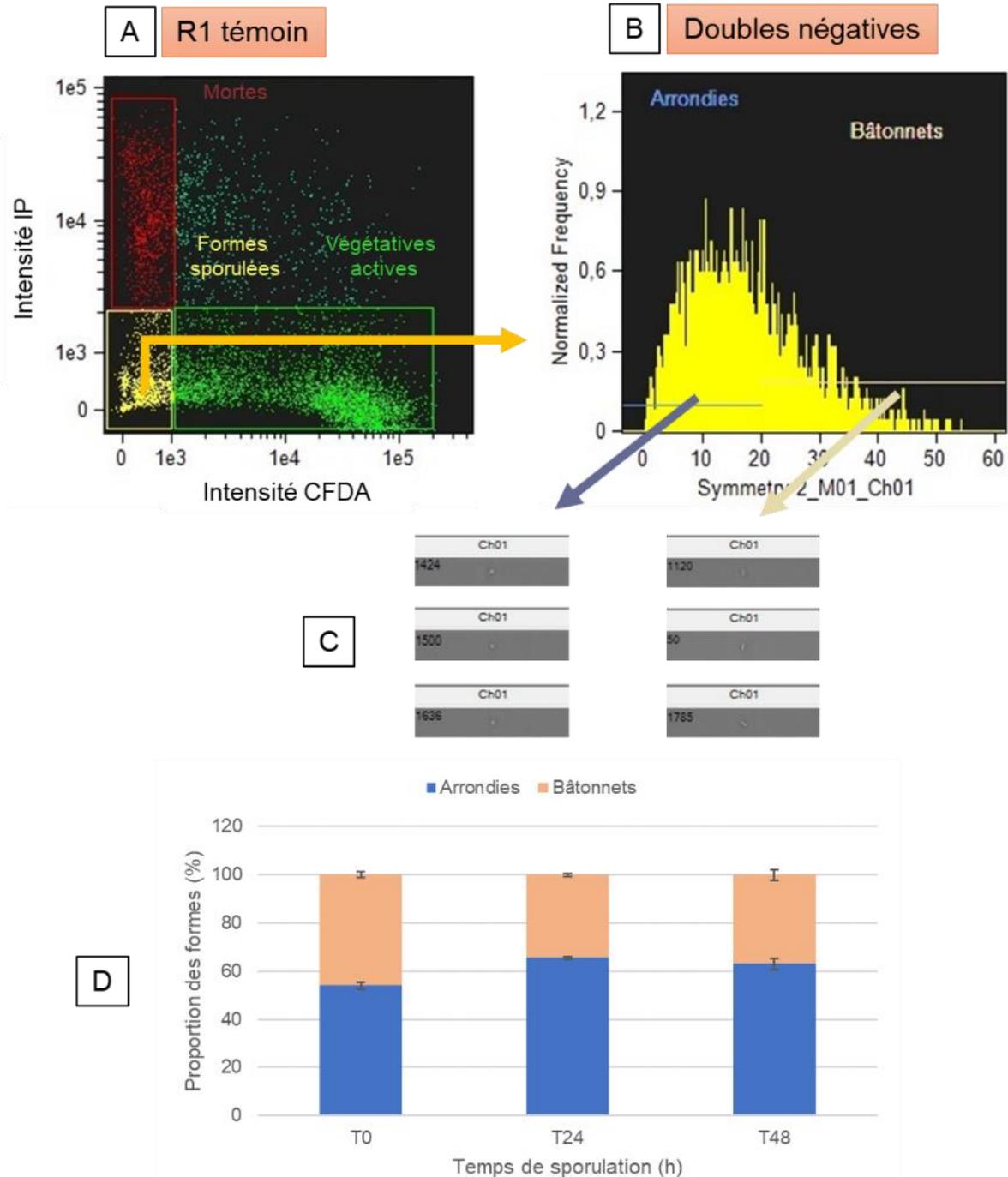


Figure 50. Evolution de la morphologie des formes sporulées (doubles négatives) de *Clostridium perfringens* au cours de la sporulation.

Figure 50A : cytochrome représentant la fluorescence rouge (IP) en fonction de la fluorescence verte (CFDA) d'un échantillon témoin.

Figure 50B : histogramme obtenu à partir du paramètre « symétrie » permettant la discrimination des formes sporulées « arrondies » et « bâtonnets » d'un échantillon témoin.

Figure 50C : images des formes arrondies et bâtonnets obtenues par l'imager en flux au sein des formes doubles négatives d'un échantillon témoin.

Figure 50D : histogrammes représentant les proportions des formes arrondies et bâtonnets au sein des formes sporulées d'un témoin après 0, 24 et 48 heures de sporulation.

Par ailleurs, les résultats montrent une légère évolution de la morphologie des formes sporulées au cours du temps (Figure 50) : on observe une augmentation de la proportion des formes « arrondies » au détriment des formes types « bâtonnets ».

Cette augmentation pourrait s'expliquer par la présence de pré-spores à  $T_0$  terminant leur cycle complet de sporulation après 24 heures dans le milieu de sporulation. Cependant, étant donné la faible proportion de spores dans l'échantillon initial ( $T_0$ ), cette observation reste hypothétique. Ces résultats soulignent néanmoins l'intérêt de cette méthode dans l'étude de la physiologie de formes sporulantes telles que *Clostridium perfringens*.

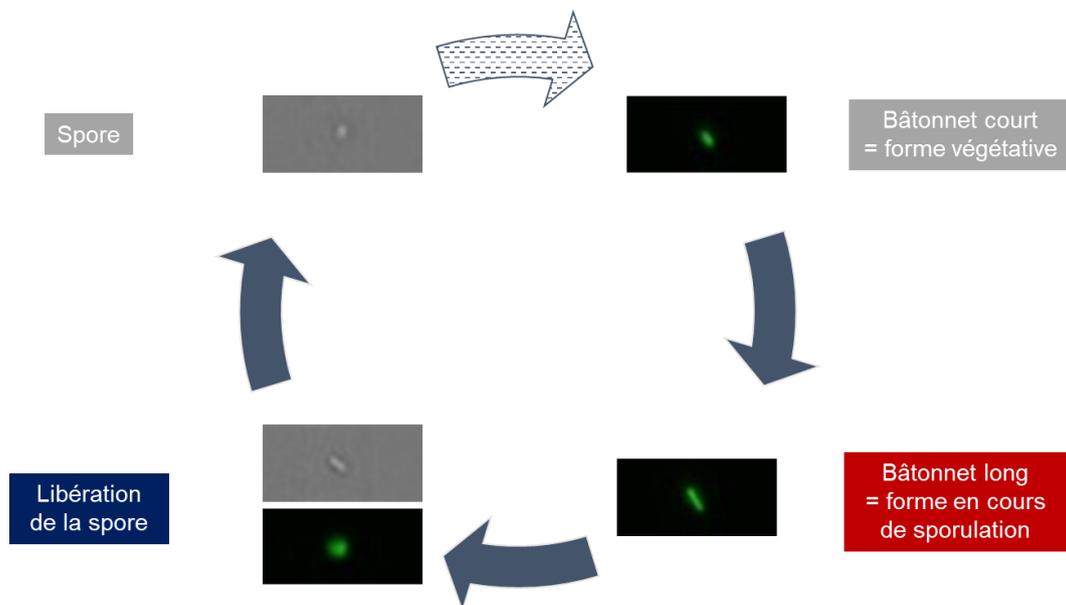


Figure 51. Potentiel cycle de sporulation de *Clostridium perfringens* dans le milieu Duncan Strong obtenu par imagerie en flux.

La diminution, au cours du temps, de la proportion des formes de types « bâtonnets » associée à une augmentation de la proportion des formes « arrondies » témoigneraient d'une sporulation de *Clostridium perfringens* dans le milieu Duncan Strong (passage des formes végétatives vers les spores) (Figure 51).

Ces résultats soulignent l'intérêt de la méthode d'imagerie en flux et la stratégie de « gating » mise au point dans l'étude de la physiologie de formes sporulantes telles que *Clostridium perfringens* dans ce milieu de culture.

Les résultats obtenus valideraient aussi la pertinence de cette méthode dans l'étude de la mise en évidence de formes sporulantes telles que *Clostridium perfringens* au cours du temps, lors des traitements d'hygiénisation qui ont été appliqués.

### III.3.2. Caractérisation des effets d'un traitement acido-thermique sur *Clostridium perfringens* par imagerie en flux

La méthodologie d'analyse précédemment décrite a donc été utilisée pour mettre en évidence les effets des différents traitements d'hygiénisation choisis dans cette étude : traitement thermique et acides faibles (AGV) seuls, ou en combinaison, sur une culture pure de *Clostridium perfringens*. Comme détaillé dans la partie matériel et méthodes, ces traitements ont été appliqués sur la culture à différents temps ( $T_0$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{48}$ ) correspondant à différents stades de sporulation identiques à ceux appliqués en cytométrie en flux. Cette approche a pour objectif d'évaluer les effets de ces traitements sur les différentes formes de *Clostridium perfringens* (végétatives ou sporulées) via un couplage avec une analyse morphologique.

La figure 52 montre les différents cytogrammes obtenus par imagerie en flux après l'application des différents traitements (acide seul, thermique seul et acido-thermique) et 24h de culture dans le milieu Duncan Strong. Les résultats obtenus aux différents temps ( $T_0$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{48}$ ) ainsi que l'interprétation de cette figure 8 sont détaillés pour chaque type de traitements (et concentrations pour les acides) dans les sous-parties suivantes.

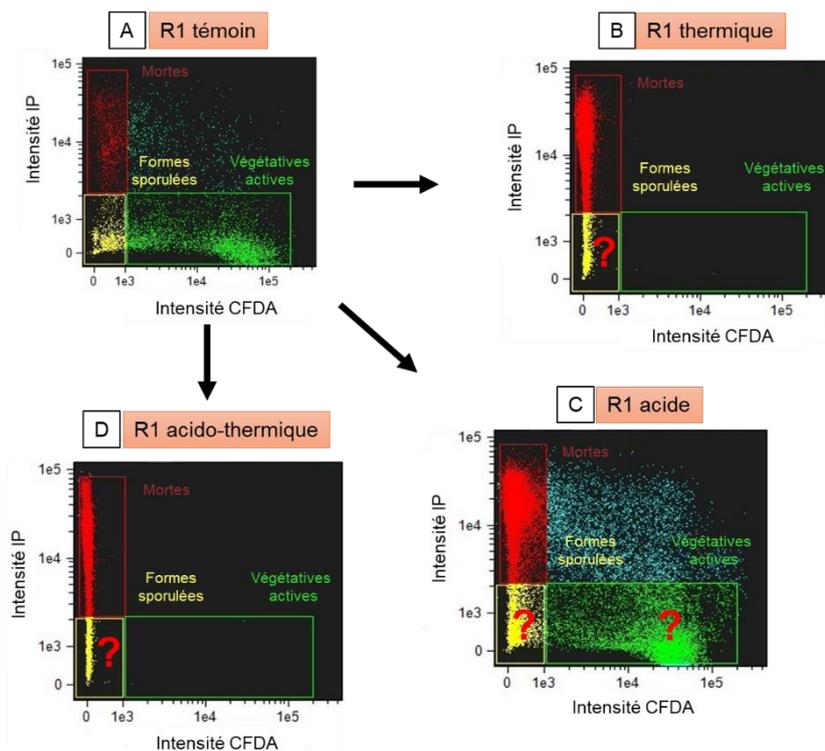


Figure 52. Exemples de cytogrammes obtenus après analyse par imagerie en flux d'un échantillon témoin (A), traité thermiquement (B), traité aux AGV (C), traité de façon acido-thermique (D) après 24h de culture dans le milieu Duncan Strong.

### III.3.2.1. Traitement thermique

Le traitement thermique (1 heure à 70°C) a été appliqué à une culture pure de *Clostridium perfringens* à différents temps, correspondants à différents stades du développement physiologiques des cellules (cf figure 33). Le temps initial ( $T_0$ ) correspond au stade dans lequel la majorité des cellules seraient sous forme végétative. Au-delà, après 24 heures et 48 heures ( $T_{24}$  et  $T_{48}$ ), la proportion de formes sporulées augmente avec le temps comme indiqué dans le chapitre III.3.1.2.

Les résultats obtenus, présentés sur la Figure 52B, montrent que le traitement thermique aboutit à une élimination totale des formes végétatives actives ou « vivantes » par comparaison au témoin non traité (Figure 52A). Seules les formes sporulées persistent. Les données confirment celles obtenues par CMF (cf Figure 2 chapitre III.2). Pour aller plus loin, l'outil imagerie en flux a été utilisé pour évaluer les effets du traitement sur le plan morphologique des populations « non marquées » correspondant aux formes sporulées (Figure 52B zone jaune).

Le paramètre « symétrie » a été utilisé afin de distinguer les formes « arrondies » et les formes « bâtonnets » au sein de la population non marquée. Les proportions relatives de ces 2 sous-populations, avant et après traitement thermique, et selon le temps de culture de *Clostridium perfringens*, sont représentées sur la Figure 53.

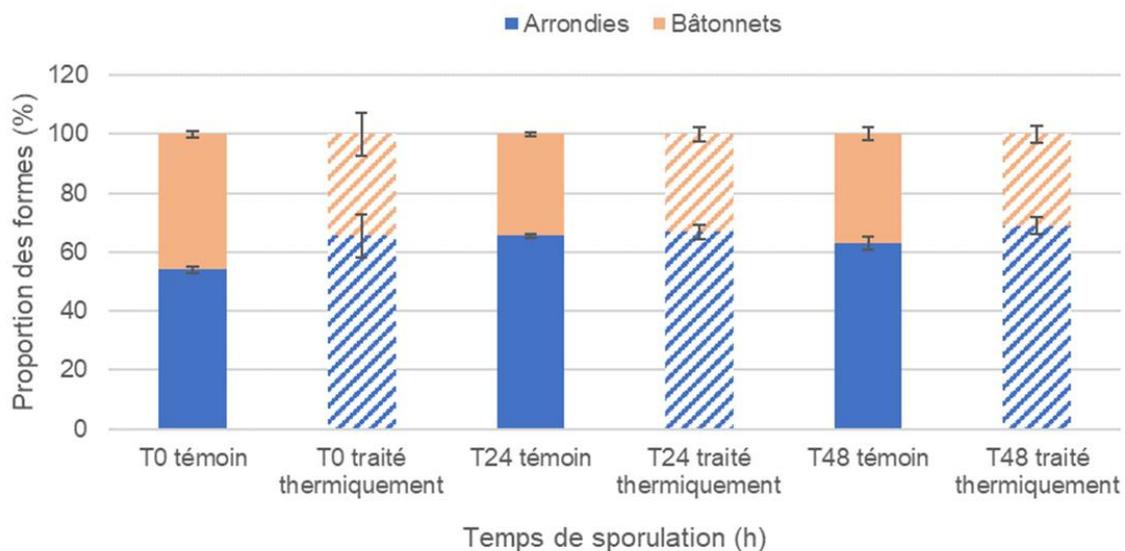


Figure 53. Analyse des effets d'un traitement thermique à 70°C pendant une heure sur *Clostridium perfringens* par imagerie en flux : histogrammes représentant les proportions des formes arrondies et bâtonnets au sein de la population de spores, au cours du temps, avant et après traitement thermique.

- Les proportions relatives des 2 sous-populations « arrondies » et « bâtonnets » de la zone correspondant aux cellules dont la structure pariétale ne permet pas la pénétration des fluorochromes restent relativement similaires et ce quel que soit le temps de culture des cellules auquel le traitement thermique est appliqué. Il est donc vraisemblable que cette sous population « bâtonnets » corresponde à des cellules en fin de sporulation.

- Toutefois, on peut noter une légère diminution de la proportion des formes « bâtonnets » suite au traitement thermique de l'échantillon à  $T_0$  (46% dans le témoin et 34% dans l'échantillon traité). Cette diminution pourrait s'expliquer probablement par la présence (minoritaire) de formes végétatives non actives au sein de cette population. Ces cellules, sous formes végétatives, seraient donc éliminées par le traitement thermique.

### III.3.2.2. Traitements acides

Pour étudier les effets du traitement acide sur *Clostridium perfringens*, les AGV ont été ajoutés une seule fois à la culture au temps initial ( $T_0$ ). Différentes concentrations (1,5 g/L, 3 g/L et 6 g/L) ont été testées en parallèle d'une culture témoin. Les échantillons ont été analysés initialement ( $T_0$ ) et après 24h ( $T_{24}$ ) et 48h ( $T_{48}$ ) d'incubation avec les AGV (cf Figure 33). L'analyse de ces effets a été ciblée sur 2 populations d'intérêt :

- Les formes « sporulées » (Figure 54) ;
- Les formes « végétatives actives » (Figure 55).

#### III.3.2.2.1. Effets sur les formes sporulées

Les résultats obtenus sur les formes sporulées sont présentés sur la figure 54. Comme précédemment, c'est le paramètre « symétrie » qui a été utilisé afin de différencier les formes « arrondies » et les formes « bâtonnets » au sein de la population non marquée. Les proportions relatives des différentes formes « arrondies » et « bâtonnets » sont présentées pour les différents temps d'incubation ( $T_0$ ,  $T_{24}$  et  $T_{48}$ ) avec les AGV à différentes concentrations (1,5 g/L, 3 g/L et 6 g/L) (Figure 53) en parallèle du témoin (non traité).

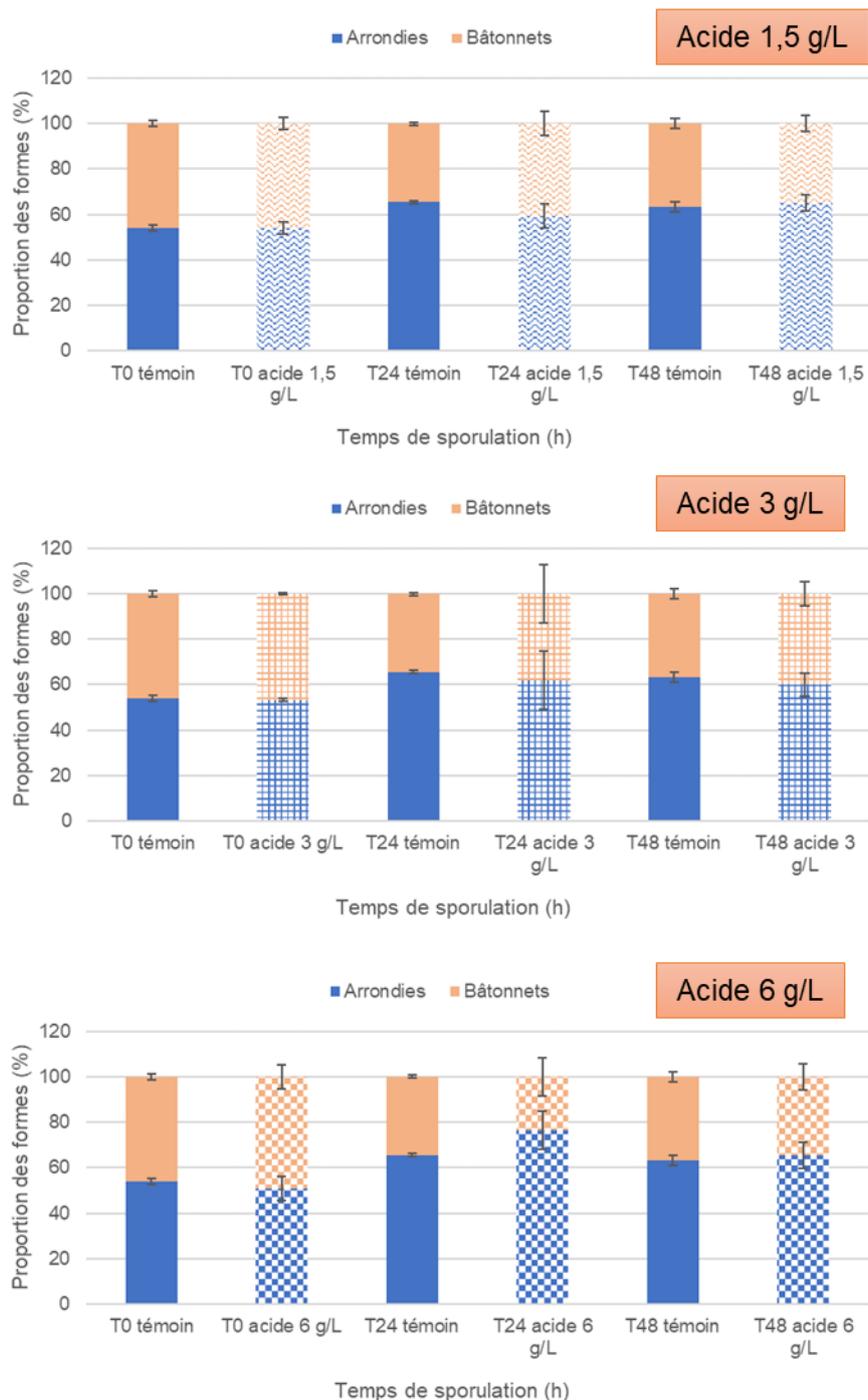


Figure 54. Analyse des effets des traitements acides sur les formes sporulées (doubles négatives) de *Clostridium perfringens* par imagerie en flux : histogrammes représentant les proportions des formes « arrondies » et « bâtonnets » au sein de la population de formes sporulées selon différentes concentrations en AGV et différents temps d'incubation.

Les résultats montrent une légère évolution de la morphologie des formes sporulées au cours du temps dans le témoin. On remarque une faible augmentation de la proportion de formes « arrondies » dans les échantillons T<sub>24</sub> et T<sub>48</sub> par comparaison au T<sub>0</sub> (respectivement 65% et 63% à T<sub>24</sub> et T<sub>48</sub> mais seulement 54% à T<sub>0</sub>). Cette augmentation pourrait s'expliquer par la présence de pré-spores à T<sub>0</sub> terminant leur cycle complet de sporulation après 24 heures

dans le milieu de sporulation. Cependant, étant donné la faible proportion de spores dans l'échantillon initial ( $T_0$ ), cette explication reste hypothétique.

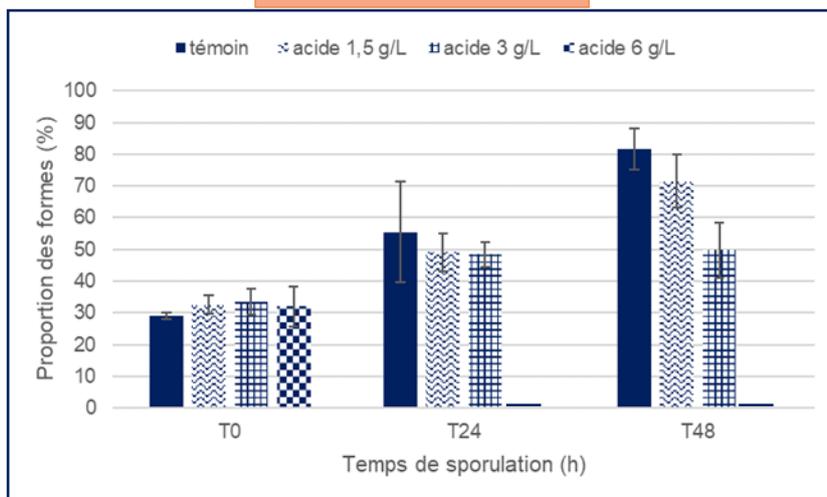
Par ailleurs, cette tendance n'est nullement influencée par les AGV. Quelle que soit la concentration en AGV introduite dans la culture, les résultats sont très similaires au témoin. Il apparaît donc, au vu de ces résultats que le traitement par AGV n'aurait pas d'influence sur les propriétés morphologiques des formes sporulées.

### **III.3.2.2.2. Effets sur les formes végétatives actives**

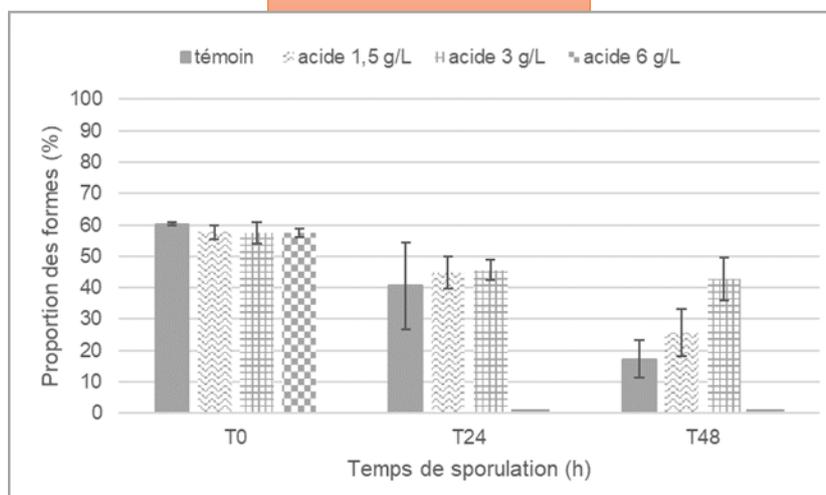
Les résultats obtenus sur les formes végétatives actives sont présentés sur la figure 12. Ce sont les paramètres « Aspect Ratio Intensity » en fonction de « Area » qui ont été utilisés pour différencier les formes arrondies des bâtonnets courts et des bâtonnets longs. Les proportions relatives des différentes formes sont présentées pour les différents temps d'incubation ( $T_0$ ,  $T_{24}$  et  $T_{48}$ ) avec les AGV à différentes concentrations (1,5 g/L, 3 g/L et 6 g/L) (Figure 55) en parallèle du témoin (non traité). Ce protocole permettrait ainsi d'évaluer les effets du traitement par AGV en fonction des 2 paramètres :

1. Le temps d'incubation avec les AGV ;
2. La concentration en AGV.

### Formes arrondies



### Bâtonnets courts



### Bâtonnets longs

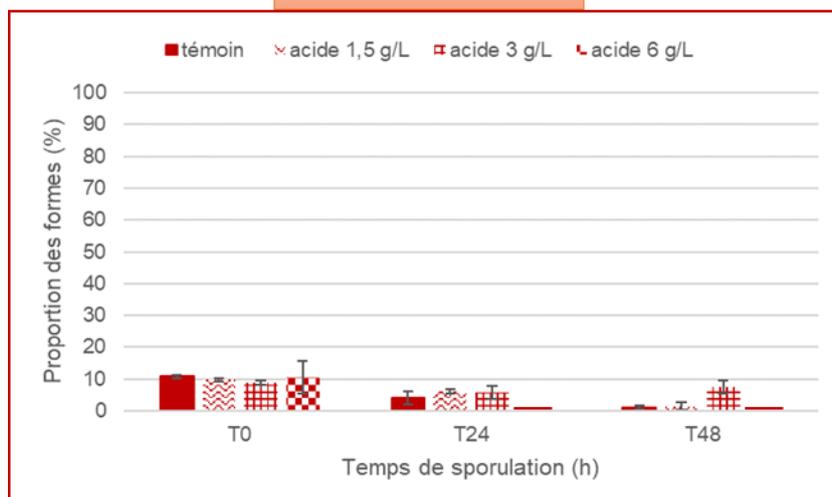


Figure 55. Analyse des effets des traitements acides sur les formes végétatives actives (vivantes) de *Clostridium perfringens* par imagerie en flux.

Dans l'échantillon témoin (non traité), une augmentation de la proportion des formes arrondies au cours du temps, est observée (Figures 49 et 55). Cette augmentation, qui s'accompagne d'une diminution des formes « bâtonnets courts », traduirait logiquement l'évolution des formes végétatives vers les formes sporulées au cours du temps, dans un milieu de culture favorisant la sporulation.

1. A  $T_0$ , les résultats obtenus montrent que la morphologie des cellules de la zone « végétatives actives » des échantillons traités resterait identique à celle du témoin. C'est-à-dire que les proportions de cellules de forme arrondie ou en forme de bâtonnet sont identiques au témoin quelle que soit la concentration en AGV. Le mécanisme d'action des AGV sur les cellules végétatives ne semble donc pas instantané.

En revanche, après 24h d'incubation avec les AGV, des effets peuvent être mis en évidence. L'augmentation de la proportion de « formes arrondies », qui peuvent potentiellement être corrélées à des formes sporulées, est significativement ralentie pour une concentration en AGV de 6 g/L. Ce phénomène se produit peut être avant. Pour cela il faudrait resserrer la zone d'étude entre 3 et 6 g/L.

Après 48h d'incubation, on observe une diminution des formes « arrondies » dès une concentration en AGV de 1,5 g/L. L'effet est d'autant plus marqué que la concentration en AGV augmente.

2. A partir d'une concentration de 6 g/L, il n'y a plus de cellules végétatives actives dès 24h d'incubation. D'un point de vue morphologique, ces résultats démontreraient l'inhibition de la sporulation suite à un traitement par AGV.

**Les conclusions apportées par ces analyses par IMF sur les formes sporulées et végétatives actives confirment donc celles obtenues par CMF :**

1. **Les AGV ne semblent pas avoir d'effet sur les formes sporulées de *Clostridium perfringens* quel que soit le temps d'incubation (Figure 54) ;**
2. **Les effets observés sur les formes végétatives ne sont pas instantanés mais apparaissent au bout de 24h ;**
3. **Après 48h d'incubation, les AGV induisent une inhibition de la sporulation des cellules végétatives et ce dès 1,5 g/L ;**
4. **Cette inhibition est d'autant plus importante que la concentration en AGV est élevée.**

### III.3.2.3. Traitements acido-thermiques

Dans le but d'évaluer l'intérêt d'un couplage de ces 2 traitements, le traitement thermique (1h à 70°C) a été appliqué après incubation de la culture de *Clostridium perfringens* en présence d'AGV à différentes concentrations : 1,5 g/L, 3 g/L et 6 g/L. L'hypothèse de départ étant fondée sur un effet potentialisant des AGV sur le traitement thermique, ce dernier a été appliqué à T<sub>0</sub> et après 24h (T<sub>24</sub>) et 48h (T<sub>48</sub>) de culture de *Clostridium perfringens* en présence d'AGV (cf Figure 33). Les échantillons ont été analysés par imagerie en flux à l'issue du traitement thermique.

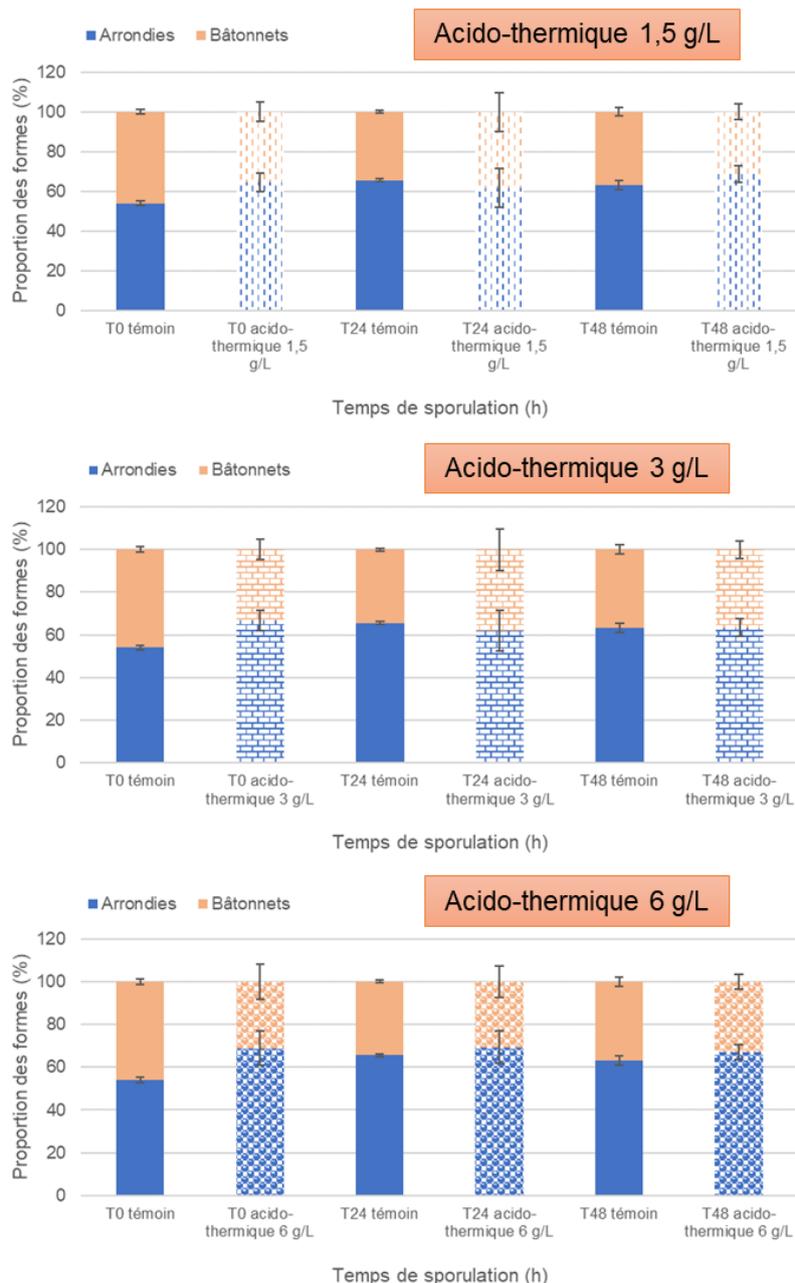


Figure 56. Analyse des effets des traitements acido-thermiques sur les formes sporulées (doubles négatives) de *Clostridium perfringens* par imagerie en flux : histogrammes représentant les proportions des formes « arrondies » et « bâtonnets » au sein de la population de formes sporulées selon différentes concentrations en AGV + traitement thermique et différents temps d'incubation.

Comme attendu, le traitement thermique conduit à une élimination totale des formes végétatives actives (Figure 52C) par comparaison au témoin non traité (Figure 52A). L'analyse des effets a donc été ciblée sur la population « non marquée » correspondant aux formes sporulées (Figure 56).

Les histogrammes représentant la proportion des formes arrondies et bâtonnets avant et après le traitement acido-thermique (Figure 56) sont très similaires à ceux obtenus après traitement acide seul (Figure 54). Aucun effet additionnel ne semblerait donc être apporté par le traitement par AGV. Les résultats obtenus ne mettent pas en évidence de modification des

propriétés morphologiques des spores suite aux différents traitements (seuls ou combinés). Toutefois, des dommages au niveau des propriétés structurales des formes sporulées ne peuvent être exclus. Surtout, cette méthode de caractérisation ne nous renseigne pas quant à la viabilité des spores traitées et leur capacité à revenir à un état végétatif *via* la germination.

Aujourd'hui, les domaines d'application de l'imagerie en flux concernent essentiellement le monde eucaryote : signalisation cellulaire, translocation nucléaire de facteurs de transcription, colocalisation de marqueurs de surface, apoptose, etc... (176). Les résultats présentés dans cette partie montrent que cette nouvelle technologie ouvre des perspectives intéressantes également dans le domaine de la microbiologie. La méthodologie d'analyse développée dans ce travail montre plus particulièrement l'intérêt de l'imagerie en flux pour l'étude de formes sporulantes. Les paramètres morphologiques « discriminants » mis en évidence dans ce travail permettent un suivi précis des différents stades de la sporulation et présentent donc un intérêt majeur.

**Appliquée à notre problématique de caractérisation des effets générés par un traitement acido-thermique sur *Clostridium perfringens*, l'imagerie en flux a permis de confirmer les résultats issus de la cytométrie en flux qui mettent en évidence des effets additionnels (Figure 57) des traitements étudiés :**

- **Le traitement thermique conduit à une élimination des cellules végétatives, mais n'a pas d'effet significatif sur les spores ;**
- **Le traitement par AGV induit une inhibition significative de la sporulation pour une concentration de 6 g/L, cependant ce résultat reste à affiner car l'inhibition n'a pas été étudiée entre 3 et 6 g/L ;**
- **La sporulation de *Clostridium perfringens* étant limitée par les AGV, ces cellules restent sous forme végétative et sont éliminées par le traitement thermique.**

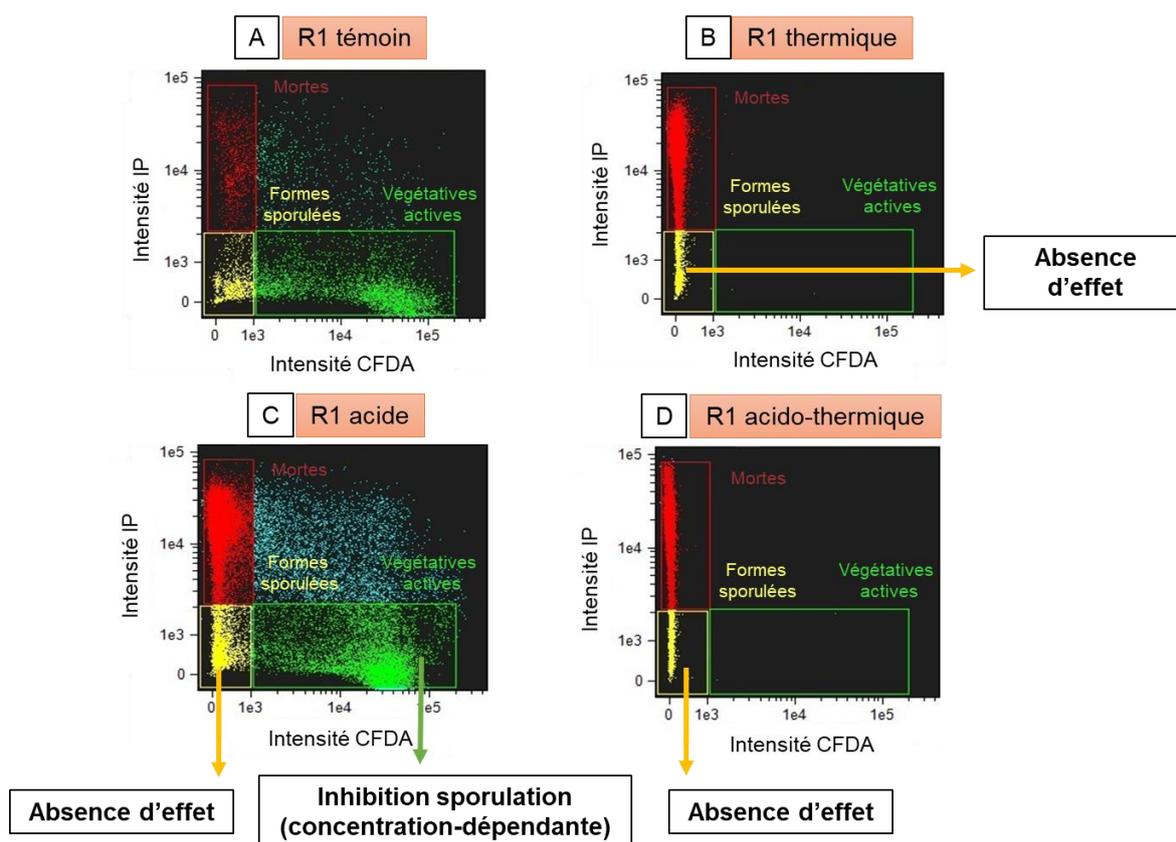


Figure 57. Cytogrammes obtenus après analyse par imagerie en flux d'un échantillon témoin (A), traité thermiquement (B), traité aux AGV (C), traité de façon acido-thermique (D) et effets des différents traitements sur les différentes populations bactériennes de *Clostridium perfringens*.

Les images ont été obtenues avec un grossissement  $\times 40$ . L'Image Stream X AMNIS® de la plateforme BISCEm étant essentiellement utilisé pour des applications sur des cellules eucaryotes, ce grossissement est suffisant dans ce cadre. En revanche, pour des applications en microbiologie, un grossissement  $\times 60$  apporterait un niveau d'information plus précis et serait donc plus approprié.

Actuellement, l'analyse des images par le logiciel IDEAS® (version 6.2) est réalisée de façon « manuelle » par l'expérimentateur. La version 6.3 du logiciel couplée à l'Intelligence Artificielle (IA) serait, à l'avenir, un moyen de mieux appréhender les données obtenues par imagerie en flux. L'Intelligence Artificielle se définit comme l'ensemble de théories et techniques mises en œuvre en vue de réaliser des machines capables de simuler l'intelligence humaine. Dans le cadre de l'IMF, menée par de puissants algorithmes, le logiciel Amnis AI® pourrait passer en revue l'ensemble des paramètres disponibles et amener à une meilleure efficacité en termes de classification d'images et de différences morphologiques. Dans le cadre de notre étude, il faudrait, pour cela, analyser séparément une culture pure de formes végétatives, de formes sporulées, de formes mortes. Enfin, le « mélange » serait analysé et comparé aux cultures pures par le logiciel Amnis AI®.

# **Conclusion générale**

La filière de la méthanisation agricole est actuellement en plein essor. La digestion anaérobie est un processus complexe représentant aujourd'hui un enjeu majeur pour : (1) la lutte contre le réchauffement climatique par la production d'énergies renouvelables ; (2) la lutte contre les déchets par la valorisation des sous-produits organiques ; (3) la récupération des ressources par la formation d'engrais. Dans l'optique d'un retour au sol des digestats, ce dernier point impose la maîtrise de leur qualité sanitaire afin de prévenir tout risque microbiologique de contamination de l'environnement.

Cette thèse avait pour but de rechercher un pré-traitement capable de potentialiser l'effet hygiénisant de la méthanisation tout en conservant ses performances. Au regard des informations issues de l'étude bibliographique et dans un souci de couplage efficacité d'hygiénisation, de maintien des performances du procédé et de faible coût énergétique, 3 types de pré-traitements ont été appliqués : les pré-traitements **acides, thermique et acido-thermiques**. Les effets de ces pré-traitements ont été caractérisés à l'échelle du procédé sur du fumier en terme de **potentiel méthanogène** et d'un point de vue **microbiologique** global. Avec les inquiétudes croissantes concernant les risques sanitaires liés aux formes sporulantes dans les digestats, l'effet de ces pré-traitements a également été évalué à l'échelle cellulaire sur une culture pure de *Clostridium perfringens*.

Dans un premier temps, le **pouvoir hygiénisant** et le potentiel méthanogène des différents pré-traitements sur le fumier ont été étudiés à **l'échelle procédé**. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt de ces pré-traitements, seuls et en couplage, sur le plan microbiologique. Un abattement significatif de la concentration en *Escherichia coli* et *Enterococcus sp.* a été obtenu. Un effet dose-dépendant a pu être démontré : plus la concentration en acides du traitement acido-thermique est importante, plus l'abattement de la concentration en *Escherichia coli* et *Enterococcus sp.* est grand. Toutefois, aucun effet sur les spores de *Clostridium perfringens* n'a été mis en évidence. De plus, une inhibition du **potentiel méthanogène** du fumier est observée suite au pré-traitement acido-thermique. La complexité de la matrice étudiée fait qu'il est difficile de pouvoir comprendre de manière plus approfondie, à l'échelle du procédé, les mécanismes d'action des pré-traitements sur les cellules bactériennes qui constituent le cœur même du problème de l'hygiénisation.

Dans un second temps, les mécanismes d'actions des différents traitements à l'échelle de la cellule ont été étudiés. Pour ce faire, les mêmes pré-traitements que ceux utilisés sur le fumier brut, seuls et en couplage, ont été appliqués sur une **culture pure de *Clostridium perfringens***. Afin d'appréhender les différents modes d'action des traitements acides, thermiques et thermo-acides, ils ont été appliqués sur des **formes végétatives**, en cours de sporulation et des **spores**. Après un double marquage des cellules réalisé avec le CFDA (marqueur d'activité enzymatique) et l'iodure de propidium (marqueur d'intégrité membranaire), les cellules ont été analysées par **cytométrie en flux** (CMF). La combinaison des traitements acide et thermique a montré des **effets additifs** sur les différentes populations de *Clostridium perfringens* : (1) la destruction des formes végétatives consécutive au traitement thermique associée à (2) un ralentissement voire une inhibition de la sporulation avec un effet dose-dépendant (effets plus importants à 6 g/L qu'à 1,5 g/L) induit par les AGV.

Pour la compréhension des mécanismes d'action de traitements bactéricides contre des formes sporulantes de type *Clostridium*, les questions relatives à la morphologie des différentes populations dans le cycle de sporulation constituent un élément clé. **L'imagerie en flux** (IMF) a donc été utilisée en complément de la CMF lors de la dernière partie de ce travail. Une stratégie globale d'analyse des données appliquée à l'étude des formes végétatives et sporulées de *Clostridium perfringens* a été développée. Les résultats obtenus mettent en évidence l'intérêt de cette technologie pour l'étude de formes sporulantes. Les paramètres morphologiques « discriminants » mis en évidence dans ce travail permettent un suivi quantitatif et qualitatif des différents stades de la sporulation et présentent donc un intérêt majeur. Appliquée à la problématique de caractérisation des effets générés par un traitement acido-thermique sur *Clostridium perfringens*, l'IMF a permis de **confirmer les résultats issus de la CMF** en mettant en évidence des effets additionnels des traitements étudiés.

Grâce à l'approche pluridisciplinaire employée dans ce travail, cette thèse aura permis d'améliorer les connaissances sur la problématique de l'hygiénisation des digestats d'une part et d'apporter une meilleure compréhension sur les mécanismes d'actions bactéricides de pré-traitements acido-thermiques contre *Clostridium perfringens* d'autre part. Elle inspire également des pistes de recherche d'intérêt.

Ce travail a permis de mettre en évidence des effets bactéricides additionnels en couplant la pasteurisation avec un traitement acide. La combinaison de différents procédés thermiques et athermiques est une approche intéressante et relativement bien maîtrisée dans le domaine de l'agro-alimentaire. Transposée à l'hygiénisation des biodéchets en général, et des intrants à la digestion anaérobie en particulier, ce concept ouvre de nombreuses possibilités d'associations. En combinant deux traitements ou plus, avec des propriétés bactéricides additionnelles ou synergiques, cette approche permet d'améliorer l'inactivation microbienne tout en diminuant les coûts énergétiques. Toutefois, le choix du couplage des technologies appropriées nécessite une bonne connaissance des mécanismes synergiques mis en jeu.

A l'échelle cellulaire, ces travaux ont permis une meilleure compréhension des effets générés par les traitements sur la sporulation de *Clostridium perfringens*. La persistance des spores traitées et leur possible reprise de croissance suite à ces traitements pourrait faire l'objet de futurs travaux complémentaires et d'intérêt majeur pour la problématique d'hygiénisation des digestats.

La méthodologie d'analyse par IMF développée dans ce travail met clairement en évidence l'intérêt de cette technologie pour l'étude de formes sporulantes. Aujourd'hui, les domaines d'application de l'imagerie en flux concernent essentiellement le monde eucaryote. Les résultats présentés dans ces travaux montrent que cette nouvelle technologie ouvre des perspectives intéressantes également dans le domaine de la microbiologie. L'intégration future d'algorithmes d'intelligence artificielle au logiciel d'analyse des données (IDEAS®) améliorera

significativement l'efficacité de cette technologie en termes de classification d'images et de caractérisation morphologique.

## Références bibliographiques

---

1. Houot S, Levavasseur F, Jimenez J. DYNAMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS LES SOLS: QUELS EFFETS DES DIGESTATS? :26.
2. Luxen P. La gestion des engrais de ferme. :37.
3. Houot S, Pons M-N, Pradel, Marilyns, Savini, Isabelle, Tibi, Anaïs. Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier. :108.
4. European Biogas Association. Rapport Statistique Méthanisation. 2020 p. 14.
5. ADEME. Methanisation en France. France; 2021 mai p. 59.
6. Chambres d'agriculture F. La méthanisation agricole [Internet]. 2022. Disponible sur: <https://chambres-agriculture.fr/exploitation-agricole/developper-des-projets/economie-et-production-denergies/la-methanisation-agricole/>
7. Schema de la méthanisation [Internet]. Disponible sur: [https://www.biogaz-energie-renouvelable.info/methanisation\\_schema.html](https://www.biogaz-energie-renouvelable.info/methanisation_schema.html)
8. ADEME. Le cadre réglementaire et juridique des activités agricoles de méthanisation et de compostage. France; 2015 janv p. 88.
9. Décret n° 2011-190 du 16 février 2011 relatif aux modalités de production et de commercialisation agricoles de biogaz, d'électricité et de chaleur par la méthanisation. 2011-190 févr 16, 2011.
10. LOI n° 2010-874 du 27 juillet 2010 de modernisation de l'agriculture et de la pêche (1). 2010-874 juill 27, 2010.
11. Astals S, Venegas C, Peces M, Jofre J, Lucena F, Mata-Alvarez J. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. Water Res. déc 2012;46(19):6218-27.
12. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. La méthanisation agricole [Internet]. 2019 [cité 9 avr 2022]. Disponible sur: <https://agriculture.gouv.fr/telecharger/95785?token=9db3f65f692cc9a3d8f9aaa721c35ccf3fa01c6a9ca2e9addf1947d85d694f85>
13. Moletta R. La méthanisation. Paris: Éd. Tec & doc : Lavoisier; 2015.
14. Escudie R, Cresson R. Méthanisation de la biomasse. Chim Verte [Internet]. nov 2017 [cité 13 déc 2021]; Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v2/bio5100>
15. Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J. janv 1993;7(1):113-23.
16. Achkar JE. Méthanisation de marc de raisin. Caractérisation et optimisation du procédé et des prétraitements. 2017;213.
17. Barbier MG, Gerin MP, Calusinska MM, Simonet MP, Benizri ME, Delfosse MP. Influence de différents facteurs opérationnels sur la structure des communautés microbiennes impliquées dans le processus de digestion anaérobie. :204.

18. Bastide G. Méthanisation (fiche technique) [Internet]. 2015 [cité 28 déc 2017]. Disponible sur: <http://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/fiche-technique-methanisation-201502.pdf>
19. AIDA. Arrêté du 10/11/09 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées de méthanisation soumises à déclaration sous la rubrique n° 2781-1 [Internet]. [cité 9 avr 2022]. Disponible sur: [https://aida.ineris.fr/consultation\\_document/4221](https://aida.ineris.fr/consultation_document/4221)
20. AIDA. Arrêté du 12/08/10 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées de méthanisation relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique « n° 2781 » de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement [Internet]. [cité 9 avr 2022]. Disponible sur: [https://aida.ineris.fr/consultation\\_document/4015](https://aida.ineris.fr/consultation_document/4015)
21. Reibel A. Valorisation agricole des digestats : Quels impacts sur les cultures, le sol et l'environnement ? Revue de littérature. mai 2018;63.
22. ARDEAR Midi-Pyrénées. Dossier spécail : la méthanisation. 2015.
23. Chenon P. Point réglementaire Digestats. 2020;11.
24. European Union. European Union. Commission Regulation (EU) No 142/2011 of 25 February 2011 Implementing Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council Laying down Health Rules as Regards Animal By-Products and Derived Products Not Intended for Human Consumption and Implementing Council Directive 97/78/EC as Regards Certain Samples and Items Exempt from Veterinary Checks at the Border under That Directive. [Internet]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02011R0142-20201208>
25. InfoMetha. Hygiénisation : la réglementation française [Internet]. [cité 26 août 2021]. Disponible sur: <https://www.infometha.org/pour-aller-plus-loin/reglementation-et-normes/hygiénisation-la-reglementation-francaise>
26. Bardou C, Durmann V, Haddad M, Phung Nam D. Méthanisation et Biomasse : quelles solutions pour quelles nuisances. :46.
27. ADEME. Estimation des gisements potentiels de substrats utilisables en méthanisation. 2013 avr p. 117.
28. Légifrance. Article D543-292 - Code de l'environnement [Internet]. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000032861237](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000032861237)
29. ADEME. La méthanisation : comment se transforme la matiere organique en energie. 2010.
30. Fosse Julien, Mourjane Ilyas. La biomasse agricole : quelles ressources pour quel potentiel énergétique ? 2021.
31. Chambre d'agriculture de l'Orne. La méthanisation des matières organiques. 2015.
32. Degueurce A. Fumiers de bovins, une ressource à fort potentiel pour la filière de méthanisation en France ? 2016;9.
33. Franco RT. Optimisation des pratiques de gestion des déchets agricoles en lien avec leur valorisation par méthanisation. 2017;260.

34. AIDA. 2781. Installation de méthanisation de déchets non dangereux ou de matière végétale brute, à l'exclusion des installations de méthanisation d'eaux usées ou de boues d'épuration urbaines lorsqu'elles sont méthanisées sur leur site de production [Internet]. [cité 9 avr 2022]. Disponible sur: [https://aida.ineris.fr/consultation\\_document/10757](https://aida.ineris.fr/consultation_document/10757)
35. Légifrance. Arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000204891/>
36. AFNOR. Amendements organiques : dénominations, spécifications et marquage. NF U 44-051; 2006. 17 p.
37. Besson M, Moletta R. Aspects sanitaires de l'épandage de digestats issus de méthanisation à la ferme. *Eau Ind Nuis.* 2010;(335):85-9.
38. ANSES. Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des MFSC. 2013 août p. 127.
39. ANSES. Avis de l'ANSES relatif aux éléments Complémentaires transmis par METHALANDES suite à l'avis de l'Anses n° 2013-0698 du 18 avril 2014 concernant la demande d'homologation pour le digestat de méthanisation ORGALAND. 2014 déc.
40. Muller F. Qualité agronomique et sanitaire des digestats. Angers: ADEME; 2011 oct p. 250.
41. Bonetta Si, Ferretti E, Bonetta Sa, Fezia G, Carraro E. Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products: Microbial contamination of digestate. *Lett Appl Microbiol.* nov 2011;53(5):552-7.
42. Watcharasukarn M, Kaparaju P, Steyer J-P, Krogfelt KA, Angelidaki I. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants. *Microb Ecol.* août 2009;58(2):221-30.
43. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. Arrêté du 13 juin 2017 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation agricoles en tant que matières fertilisantes.
44. Règlement (UE) 2019/ du Parlement européen et du Conseil du 5 juin 2019 établissant les règles relatives à la mise à disposition sur le marché des fertilisants UE, modifiant les règlements (CE) no 1069/2009 et (CE) no 1107/2009 et abrogeant le règlement (CE) no 2003/2003. p. 114.
45. Légifrance. 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 [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000042506471>
46. InfoMetha. Valorisation du digestat [Internet]. [cité 9 avr 2022]. Disponible sur: [https://www.infometha.org/sites/default/files/2020-05/Valorisation\\_digestat.png](https://www.infometha.org/sites/default/files/2020-05/Valorisation_digestat.png)
47. Orzi V, Scaglia B, Lonati S, Riva C, Boccasile G, Alborali GL, et al. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Sci Total Environ.* sept 2015;526:116-26.

48. Liu X. Hygiénisation par technologie électrique de déchets alimentaires en vue de leur méthanisation. 2019;238.
49. Règlement (UE) no 142/2011 de la Commission du 25 février 2011 portant application du règlement (CE) no 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 et portant application de la directive 97/78/CE du Conseil en ce qui concerne certains échantillons et articles exemptés des contrôles vétérinaires effectués aux frontières en vertu de cette directive Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. :254.
50. Massé D, Gilbert Y, Topp E. Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresour Technol.* janv 2011;102(2):641-6.
51. Sahlström L, Aspan A, Bagge E, Tham M-LD-, Albihn A. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* avr 2004;38(8):1989-94.
52. Pourcher A-M, Druilhe C. Impact de la digestion anaérobie sur les bactéries indicatrices et les micro-organismes pathogènes. 2016 févr 10; Limoges.
53. Xu C, Salsali H, Weese S, Warriner K. Inactivation of *Clostridium difficile* in sewage sludge by anaerobic thermophilic digestion. *Can J Microbiol.* janv 2016;62(1):16-23.
54. Pandey PK, Soupir ML. Escherichia coli inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express.* 2011;1(1):18.
55. Jiang Y, Dennehy C, Lawlor PG, Hu Z, Zhan X, Gardiner GE. Inactivation of enteric indicator bacteria and system stability during dry co-digestion of food waste and pig manure. *Sci Total Environ.* janv 2018;612:293-302.
56. Aitken MD, Sobsey MD, Van Abel NA, Blauth KE, Singleton DR, Crunk PL, et al. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle. *Water Res.* avr 2007;41(8):1659-66.
57. Thomas C, Idler C, Ammon C, Herrmann C, Amon T. Inactivation of ESBL-/AmpC-producing Escherichia coli during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of chicken manure. *Waste Manag.* févr 2019;84:74-82.
58. Smith SR, Lang NL, Cheung KHM, Spanoudaki K. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Manag.* janv 2005;25(4):417-25.
59. Lloret E, Pastor L, Pradas P, Pascual JA. Semi full-scale thermophilic anaerobic digestion (TAnD) for advanced treatment of sewage sludge: Stabilization process and pathogen reduction. *Chem Eng J.* oct 2013;232:42-50.
60. Dennehy C, Lawlor PG, McCabe MS, Cormican P, Sheahan J, Jiang Y, et al. Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics. *Waste Manag.* janv 2018;71:532-41.
61. Lund B, Jensen VF, Have P, Ahring B. Inactivation of virus during anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas reactors. *Antonie Van Leeuwenhoek.* janv 1996;69(1):25-31.

62. Labbe R, Juneja VK, Blaschek HP. CLOSTRIDIUM | Clostridium perfringens. In: Encyclopedia of Food Microbiology [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 15 avr 2020]. p. 463-7. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300000689>
63. Lloret E, Salar MJ, Blaya J, Pascual JA. Two-stage mesophilic anaerobic–thermophilic digestion for sludge sanitation to obtain advanced treated sludge. Chem Eng J. août 2013;230:59-63.
64. Le Maréchal C, Druilhe C, Repérant E, Boscher E, Rouxel S, Le Roux S, et al. Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants. MicrobiologyOpen [Internet]. oct 2019 [cité 26 août 2021];8(10). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.872>
65. Bagge E, Sahlström L, Albiñ A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. Water Res. déc 2005;39(20):4879-86.
66. Salsali H, Parker WJ, Sattar SA. The effect of volatile fatty acids on the inactivation of Clostridium perfringens in anaerobic digestion. World J Microbiol Biotechnol. mai 2008;24(5):659-65.
67. Payment P, Franco E. Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. Appl Environ Microbiol. août 1993;59(8):2418-24.
68. Rounsefell BD, O'Sullivan CA, Chinivasagam N, Batstone D, Clarke WP. Fate of pathogen indicators in a domestic blend of food waste and wastewater through a two-stage anaerobic digestion system. Water Sci Technol. 1 janv 2013;67(2):366-73.
69. Martín-Díaz J, Ruiz-Hernando M, Astals S, Lucena F. Assessing the usefulness of clostridia spores for evaluating sewage sludge hygienization. Bioresour Technol. févr 2017;225:286-92.
70. ANSES. Avis de l'ANSES relatif aux conclusions de l'autosaisine sur la méthodologie de l'évaluation qualitative des risques liés à la présence de Clostridium perfringens dans les Matières Fertilisantes et les Supports de Culture. Maisons-Alfort; 2012 juin p. 25. Report No.: 2008-SA-0257a.
71. European Commission. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. 2003.
72. Rimhanen-Finne R, Vuorinen A, Marmo S, Malmberg S, Hanninen M-L. Comparative analysis of Cryptosporidium, Giardia and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting processes. Lett Appl Microbiol. avr 2004;38(4):301-5.
73. 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. 29 juill 2020;17(15):5450.
74. Pourcher A-M, Burton C, Ziebal C, De-Guardia A. Impact of temperature-time combinations on enteric bacteria in separated solids from pig manure. 2009;5.
75. Mani-López E, García HS, López-Malo A. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. Food Res Int. mars 2012;45(2):713-21.

76. ten Brummeler E. Full scale experience with the BIOCEL process. *Water Sci Technol.* 1 févr 2000;41(3):299-304.
77. Kunte DP, Yeole TY, Ranade DR. Effect of volatile fatty acids on *Shigella dysenteriae* during anaerobic digestion of human night soil. 20 juin 2000;4.
78. Salsali HR, Parker WJ, Sattar SA. Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Can J Microbiol.* 1 avr 2006;52(4):279-86.
79. Hong SM, Park JK, Lee YO. Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids. *Water Res.* mars 2004;38(6):1615-25.
80. Hong SM, Park JK, Teeradej N, Lee YO, Cho YK, Park CH. Pretreatment of Sludge with Microwaves for Pathogen Destruction and Improved Anaerobic Digestion Performance. *Water Environ Res.* janv 2006;78(1):76-83.
81. Martin DI, Margaritescu I, Cirstea E, Togoe I, Ighigeanu D, Nemtanu MR, et al. Application of accelerated electron beam and microwave irradiation to biological waste treatment. *Vacuum.* mars 2005;77(4):501-6.
82. Pino-Jelcic SA, Hong SM, Park JK. Enhanced Anaerobic Biodegradability and Inactivation of Fecal Coliforms and *Salmonella* spp. in Wastewater Sludge by Using Microwaves. *Water Environ Res.* févr 2006;78(2):209-16.
83. Akgul D, Cella MA, Eskicioglu C. Influences of low-energy input microwave and ultrasonic pretreatments on single-stage and temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) of municipal wastewater sludge. *Energy.* mars 2017;123:271-82.
84. Ruiz-Hernando M, Martín-Díaz J, Labanda J, Mata-Alvarez J, Llorens J, Lucena F, et al. Effect of ultrasound, low-temperature thermal and alkali pre-treatments on waste activated sludge rheology, hygienization and methane potential. *Water Res.* sept 2014;61:119-29.
85. Chu C. "Weak" ultrasonic pre-treatment on anaerobic digestion of flocculated activated biosolids. *Water Res.* juin 2002;36(11):2681-8.
86. Mushtaq M, Banks CJ, Heaven S. Evaluation of pressurised carbon dioxide pre-treatment aimed at improving the sanitisation and anaerobic digestibility of co-settled sewage sludge. *J Environ Sci Health Part A.* 23 févr 2019;54(3):261-8.
87. Keles C, Icemer GT, Ozen S. Inactivation of *Salmonella* spp. by Low-Frequency Electric Fields in Sewage Sludge. 2010;10(06):7.
88. Russell AD. Lethal Effects of Heat on Bacterial Physiology and Structure. *Sci Prog.* févr 2003;86(1-2):115-37.
89. De los Cobos-Vasconcelos D, Villalba-Pastrana ME, Noyola A. Effective pathogen removal by low temperature thermal pre-treatment and anaerobic digestion for Class A biosolids production from sewage sludge. *J Water Sanit Hyg Dev.* 1 mars 2015;5(1):56-63.
90. Fubin Y, Zifu L, Saino M, Hongmin D. Performance of alkaline pretreatment on pathogens inactivation and sludge solubilization. *Biol Eng.* 10:8.

91. Devlin DC, Esteves SRR, Dinsdale RM, Guwy AJ. The effect of acid pretreatment on the anaerobic digestion and dewatering of waste activated sludge. *Bioresour Technol.* mars 2011;102(5):4076-82.
92. Tommasi T, Sassi G, Ruggeri B. Acid pre-treatment of sewage anaerobic sludge to increase hydrogen producing bacteria HPB: effectiveness and reproducibility. *Water Sci Technol.* 1 oct 2008;58(8):1623-8.
93. Smith CJ, Olszewska MA, Diez-Gonzalez F. Selection and application of natural antimicrobials to control *Clostridium perfringens* in sous-vide chicken breasts inhibition of *C. perfringens* in sous-vide chicken. *Int J Food Microbiol.* juin 2021;347:109193.
94. Tan SM, Lee SM, Dykes GA. Acetic Acid Induces pH-Independent Cellular Energy Depletion in *Salmonella enterica*. *Foodborne Pathog Dis.* mars 2015;12(3):183-9.
95. Bauza-Kaszewska J, Paluszak Z, Keutgen AJ. Effect of formic acid and heat treatment on *Clostridium sporogenes* spores inactivation in animal by-products. *Med Weter.* 2014;5.
96. Luukkonen T, Heyninck T, Rämö J, Lassi U. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. *Water Res.* nov 2015;85:275-85.
97. Shin J-H, Lee S-Y, Dougherty RH, Rasco B, Kang D-H. Combined effect of mild heat and acetic acid treatment for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in an asparagus puree. *J Appl Microbiol.* nov 2006;101(5):1140-51.
98. Garcia-Alvarado JS, Labbe RG, Rodriguez MA. Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens* Type A at 37 and 43°C. :4.
99. Alnoman M, Udompijitkul P, Paredes-Sabja D, Sarker MR. The inhibitory effects of sorbate and benzoate against *Clostridium perfringens* type A isolates. *Food Microbiol.* juin 2015;48:89-98.
100. Akhtar S, Paredessabja D, Sarker M. Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth. *Food Microbiol.* sept 2008;25(6):802-8.
101. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ, Coyette J, Joseleau J-P, Perraud R. *Microbiologie de Prescott.* 2018.
102. Aldrete-Tapia JA, Torres JA. Enhancing the Inactivation of Bacterial Spores during Pressure-Assisted Thermal Processing. *Food Eng Rev [Internet].* 22 août 2020 [cité 19 août 2021]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-020-09252-x>
103. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM. Brock, *Biologie des micro-organismes.* Paris: Pearson Education; 2007.
104. Gauvry E, Mathot A-G, Couvert O, Leguérinel I, Coroller L. Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *Int J Food Microbiol.* janv 2021;337:108915.
105. Bressuire-Isoard C, Broussolle V, Carlin F. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiol Rev.* 1 sept 2018;42(5):614-26.

106. Li J, Paredes-Sabja D, Sarker MR, McClane BA. *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. Eichenberger P, Driks A, éditeurs. *Microbiol Spectr* [Internet]. 6 mai 2016 [cité 17 août 2021];4(3). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015>
107. Varga J, Stirewalt VL, Melville SB. The CcpA Protein Is Necessary for Efficient Sporulation and Enterotoxin Gene ( *cpe* ) Regulation in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*. 15 août 2004;186(16):5221-9.
108. Gauvry E, Mathot A-G, Leguérinel I, Couvert O, Postollec F, Broussolle V, et al. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res Microbiol*. mai 2017;168(4):369-78.
109. Baril E. Quantification de l'influence de l'environnement sur la formation et la thermo-résistance des spores bactériennes. Bretagne Occidentale; 2011.
110. Talukdar PK, Olguin-Araneda V, Alnoman M, Paredes-Sabja D, Sarker MR. Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Res Microbiol*. mai 2015;166(4):225-35.
111. Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*. oct 2000;407(6806):897-900.
112. Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET. The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev*. mars 2015;79(1):19-37.
113. Setlow P, Wang S, Li Y-Q. Germination of Spores of the Orders *Bacillales* and *Clostridiales*. *Annu Rev Microbiol*. 8 sept 2017;71(1):459-77.
114. Okamura S, Urakami K, Kimata M, Aoshima T, Shimamoto S, Moriyama R, et al. The N-terminal prepeptide is required for the production of spore cortex-lytic enzyme from its inactive precursor during germination of *Clostridium perfringens* S40 spores. *Mol Microbiol*. août 2000;37(4):821-7.
115. Orsburn B, Melville SB, Popham DL. Factors Contributing to Heat Resistance of *Clostridium perfringens* Endospores. *Appl Environ Microbiol*. juin 2008;74(11):3328-35.
116. Setlow B, Atluri S, Kitchel R, Koziol-Dube K, Setlow P. Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective / -Type Small Acid-Soluble Proteins. *J Bacteriol*. 1 juin 2006;188(11):3740-7.
117. Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1 sept 2000;64(3):548-72.
118. Paredes-Sabja D, Gonzalez M, Sarker MR, Torres JA. Combined Effects of Hydrostatic Pressure, Temperature, and pH on the Inactivation of Spores of *Clostridium perfringens* Type A and *Clostridium sporogenes* in Buffer Solutions. *J Food Sci*. août 2007;72(6):M202-6.
119. Bull MK, Olivier SA, van Diepenbeek RJ, Kormelink F, Chapman B. Synergistic Inactivation of Spores of Proteolytic *Clostridium botulinum* Strains by High Pressure and Heat Is Strain and Product Dependent. *Appl Environ Microbiol*. 15 janv 2009;75(2):434-45.
120. Luong TSV, Moir C, Chandry PS, Pinfold T, Olivier S, Broussolle V, et al. Combined high pressure and heat treatment effectively disintegrates spore membranes and inactivates

*Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in acidic fruit juice beverage. *Innov Food Sci Emerg Technol.* déc 2020;66:102523.

121. Modugno C. Effets d'un traitement combinant hautes pressions et biopréservation sur l'inactivation et la reprise de croissance des spores de *Bacillus* et *Clostridium*.

122. Reineke K, Mathys A, Heinz V, Knorr D. Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. *Trends Microbiol.* juin 2013;21(6):296-304.

123. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol.* sept 2006;101(3):514-25.

124. Evelyn, Milani E, Silva FVM. Comparing high pressure thermal processing and thermosonication with thermal processing for the inactivation of bacteria, moulds, and yeasts spores in foods. *J Food Eng.* déc 2017;214:90-6.

125. Evelyn, Silva FVM. Use of power ultrasound to enhance the thermal inactivation of *Clostridium perfringens* spores in beef slurry. *Int J Food Microbiol.* août 2015;206:17-23.

126. AFSSA. Fiche de *Clostridium perfringens*. 2006.

127. Wang G, Paredes-Sabja D, Sarker MR, Green C, Setlow P, Li Y. Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*. *J Appl Microbiol.* oct 2012;113(4):824-36.

128. Byrne B, Dunne G, Bolton DJ. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol.* déc 2006;23(8):803-8.

129. Juneja VK, Thippareddi H, Friedman M. Control of *Clostridium perfringens* in Cooked Ground Beef by Carvacrol, Cinnamaldehyde, Thymol, or Oregano Oil during Chilling†. *J Food Prot.* 1 juill 2006;69(7):1546-51.

130. Juneja VK, Friedman M. Carvacrol, Cinnamaldehyde, Oregano Oil, and Thymol Inhibit *Clostridium perfringens* Spore Germination and Outgrowth in Ground Turkey during Chilling†. *J Food Prot.* 1 janv 2007;70(1):218-22.

131. Juneja VK, Bari ML, Inatsu Y, Kawamoto S, Friedman M. Control of *Clostridium perfringens* Spores by Green Tea Leaf Extracts during Cooling of Cooked Ground Beef, Chicken, and Pork†. *J Food Prot.* 1 juin 2007;70(6):1429-33.

132. Juneja VK, Thippareddi H, Bari L, Inatsu Y, Kawamoto S, Friedman M. Chitosan Protects Cooked Ground Beef and Turkey Against *Clostridium perfringens* Spores During Chilling. *J Food Sci.* août 2006;71(6):M236-40.

133. Udompijitkul P, Paredes-Sabja D, Sarker MR. Inhibitory Effects of Nisin Against *Clostridium perfringens* Food Poisoning and Nonfood-Borne Isolates. *J Food Sci.* janv 2012;77(1):M51-6.

134. Myers MI, Sebranek JG, Dickson JS, Shaw AM, Tarté R, Adams KR, et al. Implications of Decreased Nitrite Concentrations on *Clostridium perfringens* Outgrowth during Cooling of Ready-to-Eat Meats. *J Food Prot.* 1 janv 2016;79(1):153-6.

135. Velugoti PR, Bohra LK, Juneja VK, Thippareddi H. Inhibition of Germination and Outgrowth of *Clostridium perfringens* Spores by Lactic Acid Salts during Cooling of Injected Turkey†. *J Food Prot.* 1 avr 2007;70(4):923-9.
136. Valenzuela-Martinez C, Pena-Ramos A, Juneja VK, Korasapati NR, Burson DE, Thippareddi H. Inhibition of *Clostridium perfringens* Spore Germination and Outgrowth by Buffered Vinegar and Lemon Juice Concentrate during Chilling of Ground Turkey Roast Containing Minimal Ingredients†. *J Food Prot.* 1 mars 2010;73(3):470-6.
137. Li L, Valenzuela-Martinez C, Redondo M, Juneja VK, Burson DE, Thippareddi H. Inhibition of *Clostridium perfringens* Spore Germination and Outgrowth by Lemon Juice and Vinegar Product in Reduced NaCl Roast Beef. *J Food Sci.* nov 2012;77(11):M598-603.
138. Scannell AGM, Ross RP, Hill C, Arendt EK. An Effective Lactacin Biopreservative in Fresh Pork Sausage. *J Food Prot.* 1 mars 2000;63(3):370-5.
139. Biokar Diagnostics. Fiche technique gélose TSN.
140. Roszak DB, Colwell RR. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *MICROBIOL REV.* 1987;51:15.
141. Helmi K. Application de la cytométrie en flux pour le contrôle microbiologique de l'efficacité de traitements de l'eau. Cergy-Pontoise; 2016.
142. Loison P. Etude de la spore de *Bacillus subtilis*: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Bourgoigne; 2013.
143. Rabi R, Turnbull L, Whitchurch CB, Awad M, Lyras D. Structural Characterization of *Clostridium sordellii* Spores of Diverse Human, Animal, and Environmental Origin and Comparison to *Clostridium difficile* Spores. Ellermeier CD, éditeur. *mSphere* [Internet]. 25 oct 2017 [cité 7 janv 2022];2(5). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.00343-17>
144. Brunt J, Cross KL, Peck MW. Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. *Food Microbiol.* oct 2015;51:45-50.
145. Yaqub S, Anderson JG, MacGregor SJ, Rowan NJ. Use of a fluorescent viability stain to assess lethal and sublethal injury in food-borne bacteria exposed to high-intensity pulsed electric fields. *Lett Appl Microbiol.* sept 2004;39(3):246-51.
146. Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.* oct 2000;2(12):1523-35.
147. Kolek J, Branska B, Drahokoupil M, Patakova P, Melzoch K. Evaluation of viability, metabolic activity and spore quantity in clostridial cultures during ABE fermentation. Sauer M, éditeur. *FEMS Microbiol Lett.* mars 2016;363(6):fnw031.
148. Borch-Pedersen K, Mellegård H, Reineke K, Boysen P, Sevenich R, Lindbäck T, et al. Effects of High Pressure on *Bacillus licheniformis* Spore Germination and Inactivation. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(14):13.
149. Fan L, Hou F, Muhammad AI, Ruiling LV, Watharkar RB, Guo M, et al. Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores. *Food Res Int.* févr 2019;116:1094-102.

150. Branska B, Pechacova Z, Kolek J, Vasytkivska M, Patakova P. Flow cytometry analysis of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 populations exhibiting different phenotypes induced by changes in cultivation conditions. *Biotechnol Biofuels*. déc 2018;11(1):99.
151. Comas-Riu J, Vives-Rego J. Cytometric monitoring of growth, sporogenesis and spore cell sorting in *Paenibacillus polymyxa* (formerly *Bacillus polymyxa*). *J Appl Microbiol*. mars 2002;92(3):475-81.
152. Ganguly J, Tempelaars M, Abee T, van Kranenburg R. Characterization of sporulation dynamics of *Pseudoclostridium thermosuccinogenes* using flow cytometry. *Anaerobe*. juin 2020;63:102208.
153. Laflamme C, Lavigne S, Ho J, Duchaine C. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *J Appl Microbiol*. avr 2004;96(4):684-92.
154. Lv R, Muhammad AI, Zou M, Yu Y, Fan L, Zhou J, et al. Hurdle enhancement of acidic electrolyzed water antimicrobial efficacy on *Bacillus cereus* spores using ultrasonication. *Appl Microbiol Biotechnol*. mai 2020;104(10):4505-13.
155. Lv R, Zou M, Chantapakul T, Chen W, Muhammad AI, Zhou J, et al. Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Appl Microbiol Biotechnol*. mars 2019;103(5):2329-38.
156. Mtimet N, Trunet C, Mathot A-G, Venaille L, Leguérinel I, Coroller L, et al. Walking dead: Permeabilization of heat-treated *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 spores under growth-preventing conditions. *Food Microbiol*. juin 2017;64:126-34.
157. Patakova P, Linhova M, Vykydalova P, Branska B, Rychtera M, Melzoch K. Use of fluorescent staining and flow cytometry for monitoring physiological changes in solventogenic clostridia. *Anaerobe*. oct 2014;29:113-7.
158. Kepner RL, Pratt JR. Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present. 1994;58:13.
159. Patakova P, Branska B, Sedlar K, Vasytkivska M, Jureckova K, Kolek J, et al. Acidogenesis, solventogenesis, metabolic stress response and life cycle changes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 at the transcriptomic level. *Sci Rep*. déc 2019;9(1):1371.
160. Vorobjev IA, Barteneva NS. Quantitative Functional Morphology by Imaging Flow Cytometry. In: Barteneva NS, Vorobjev IA, éditeurs. *Imaging Flow Cytometry* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016 [cité 11 nov 2021]. p. 3-11. (Methods in Molecular Biology; vol. 1389). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3302-0\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3302-0_1)
161. AFNOR. Boues, bio-déchets traités, sols et déchets - Calcul de la teneur en matière sèche par détermination du résidu sec ou de la teneur en eau. NF EN 15934; 2012. 26 p.
162. AFNOR. Sols, déchets, biodéchets traités et boues - Détermination de la perte au feu. NF EN 15935; 2021. 19 p.
163. Liu X, Lendormi T, Lanoisellé J-L. Conventional and Innovative Hygienization of Feedstock for Biogas Production: Resistance of Indicator Bacteria to Thermal Pasteurization, Pulsed Electric Field Treatment, and Anaerobic Digestion. *Energies*. 31 mars 2021;14(7):1938.
164. AFNOR. Microbiologie des aliments - Traitements thermiques préalables au dénombrement ou à la recherche de spores bactériennes. NF V08-250; 2010. 10 p.

165. AFNOR. Caractérisation des boues - Détection et dénombrement des Escherichia coli dans les boues, les sols, les amendements du sol, les supports de culture et les biodéchets. FD CEN/TR 15214-2; 2006. 33 p.
166. AFNOR. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires. NF EN ISO 9308-3; 1999. 38 p.
167. Jarvis B, Wilrich C, Wilrich P-T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values: Derivation of MPNs and their parameters. J Appl Microbiol. 2 juill 2010;no-no.
168. AFNOR. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires. NF-EN ISO 7899-1; 1999. 34 p.
169. Bachmann N, Deront M, Fruteau H, Holliger C, Membrez Y, Wellinger A. Optimisation des tests standardisés de digestibilité dans des réacteurs batch. Lausanne: Office fédéral de l'énergie; 2011 déc p. 79. Report No.: 154365/103311.
170. Passos F, Ortega V, Donoso-Bravo A. Thermochemical pretreatment and anaerobic digestion of dairy cow manure: Experimental and economic evaluation. Bioresour Technol. mars 2017;227:239-46.
171. ANSES. Fiche technique Clostridium perfringens. 2017.
172. Abbas AA. Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de Bacillus cereus.
173. Mayol J-F, Laplace-Builhe C, Muller CD. La cytométrie en flux. 2e éd. Paris: Lavoisier-Tec & doc; 2020.
174. Cuny A. Etude de la dynamique de bactéries pathogènes lors du stockage de produits résiduaires organiques issus de la méthanisation: influence de déterminants biotiques (activité microbienne) et de la biodisponibilité de la matière organique. :55.
175. Amnis Corporation. Image Data Exploration and Analysis Software User's Manual. 2015.
176. Marchal L. La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés: exploration phénotypique et fonctionnelle. [Nancy]: Université de Lorraine; 2012.

## Digestion anaérobie agricole : Mise en place et optimisation d'un pré-traitement thermique pour l'inactivation des spores de *Clostridium*.

---

Aujourd'hui en plein essor, la filière de la méthanisation agricole apparaît comme une option de choix face aux enjeux environnementaux et écologiques actuels. Toutefois, compte tenu de la présence de micro-organismes potentiellement pathogènes dans les effluents d'élevage, la digestion anaérobie des déchets organiques interroge la communauté scientifique et les autorités sanitaires quant à l'innocuité sanitaire des digestats. L'objectif de ces travaux de thèse a été d'évaluer les potentialités d'un pré-traitement (thermique, chimique, et en couplage) à diminuer la charge microbiologique d'intrants d'origine agricole, tout en conservant les performances de la digestion anaérobie. Dans ce but, les effets de ces pré-traitements ont été étudiés d'un point de vue microbiologique (rendements d'élimination des micro-organismes indicateurs sur le fumier bovin dans cette étude) mais aussi sur les performances du procédé de méthanisation (test BMP). L'effet de ces pré-traitements a également été évalué à l'échelle cellulaire sur une culture pure de *Clostridium perfringens* par cytométrie en flux et imagerie en flux. A l'échelle du procédé, un abattement significatif de la concentration en *Escherichia coli* et *Enterococcus sp.* a été obtenu. Un effet dose-dépendant a pu être démontré : plus la concentration en acides du traitement acido-thermique est importante, plus l'abattement de la concentration en *Escherichia coli* et *Enterococcus sp.* est grand. Toutefois, aucun effet sur les spores de *Clostridium perfringens* n'a été mis en évidence. De plus, une inhibition du potentiel méthanogène du fumier est observée suite au pré-traitement acido-thermique. A l'échelle cellulaire, la combinaison des traitements acide et thermique a montré des effets additifs sur les différentes populations de *Clostridium perfringens*. Le traitement thermique conduit à la destruction des formes végétatives et le traitement acide (acides gras volatils) conduit à un ralentissement voire une inhibition de la sporulation avec un effet dose-dépendant. Une stratégie globale d'analyse des données par imagerie en flux a été développée et appliquée à l'étude des formes végétatives et sporulées de *Clostridium perfringens*. Les résultats obtenus mettent en évidence l'intérêt de cette technologie pour l'étude de formes sporulantes. Grâce à l'approche pluridisciplinaire de ce travail, cette thèse aura permis d'améliorer les connaissances sur la problématique de l'hygiénisation des digestats d'une part et d'apporter une meilleure compréhension sur les mécanismes d'actions bactéricides de pré-traitements acido-thermiques contre *Clostridium perfringens* d'autre part.

---

Mots-clés : Hygiénisation, Méthanisation agricole, Pré-traitement, *Clostridium perfringens*, Imagerie en Flux.

## Agricultural anaerobic digestion: Implementation and optimization of a thermal pre-treatment for inactivation of *Clostridium* spores.

---

Nowadays, expanding rapidly, agricultural anaerobic digestion appears to be a great option to deal with global environmental challenges. However, given the presence of potentially pathogenic microorganisms in livestock effluents, anaerobic digestion of organic waste questions the scientific community and health authorities concerning digestates' health safety. The objective of this thesis was to evaluate potentialities of a pre-treatment (thermal, chemical and in coupling) to reduce the microbiological load of agricultural inputs while maintaining anaerobic digestion performance. For this purpose, pre-treatments effects were studied from a microbiological point of view (yields of elimination of indicator microorganisms on cattle manure in this study) but also on anaerobic digestion process performance (BMP test). Pre-treatments effects were also evaluated, at a cellular level, on a pure culture of *Clostridium perfringens* by flow cytometry and flow imaging. At the process scale, a significant reduction of *Escherichia coli* and *Enterococcus sp.* concentration was reached. A dose-dependent effect has been demonstrated: the greater the acids concentration from the acidic-thermal treatment, the greater the reduction of the concentration of *Escherichia coli* and *Enterococcus sp.* concentration is important. However, no effect on *Clostridium perfringens* spores has been demonstrated. Moreover, an inhibition of the methanogenic potential of the manure is observed following the acidic thermal pre-treatment. At the cellular level, the combination of acidic and thermal treatments showed additive effects on the different populations of *Clostridium perfringens*. The thermal treatment leads to the destruction of the vegetative forms and the acidic treatment (volatile fatty acids) leads to a slowing down or even an inhibition of sporulation with a dose-dependent effect. A global strategy for analyzing data by flow imaging has been developed and applied to the study of vegetative and sporulated forms of *Clostridium perfringens*. The results obtained highlight the interest of this technology for the study of sporulating forms. On the one hand, thanks to the multidisciplinary approach of this work, this thesis will have made it possible to improve knowledge on the problem of the hygienization of digestates and, on the other hand, to bring a better understanding of the mechanisms of bactericidal actions of acidic thermal pre-treatments against *Clostridium perfringens*.

---

Keywords: Hygienization, Agricultural anaerobic digestion, Pre-treatment, *Clostridium perfringens*, Imaging flow.

