

Résultats des analyses microbiologiques du digestat réalisées dans le cadre de VALDIPRO

Compilation des données IF2O, DIVA et autres sites

Une première campagne d'analyses microbiologiques a été lancée début 2013, dans le cadre du programme VALDIPRO. Elle visait à évaluer l'évolution de la qualité microbiologique de digestats lors du procédé de méthanisation et des potentiels post-traitements.

Les prélèvements ont été réalisés sur 8 sites, permettant de représenter une diversité de catégories d'intrants et de technologies de traitement de la matière organique.

Des échantillons de tous les substrats animaux et tous les digestats produits ont été prélevés selon un protocole rigoureux (cf. guide échantillonnage VALDIPRO). L'ensemble des paramètres listés dans le guide ANSES pour une homologation sur grandes cultures a été analysé.

Suite aux résultats de la première campagne, les résultats sur Entérocoques ont nécessité un approfondissement. En effet, la méthode NF EN ISO 7899-1 préconisée par le guide ANSES et souvent abrégée ici en « méthode npp » (nombre le plus probable) donne parfois des valeurs anormalement élevées pour certains digestats.

Une seconde campagne a donc été lancée sur digestats bruts, où la méthode npp a été comparée à une méthode proposée par IRSTEA : la méthode Slanetz.

3 sites produisant un digestat brut sans hygiénisation ont été sélectionnés. Sur chaque site, 3 échantillons ont été prélevés et envoyés auprès de 2 laboratoires dans lesquels les analyses ont été réalisées sur les 2 méthodes. L'analyse du paramètre *E. Coli* a également été effectuée sur chaque échantillon.

L'ensemble des résultats présentés ci-après est donc issu de ces deux premières campagnes d'analyses, ainsi que de la compilation de données issues du programme ANR DIVA, ou transmises par l'IF2O et les exploitants d'unités de méthanisation.

1. Le guide ANSES (<https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/DPR-Ft-MFSC-2013-08.pdf>)

Ce guide propose des méthodes d'analyse et présente un tableau des valeurs références pour évaluer l'innocuité des matières fertilisantes. Le tableau ci-dessous résume les valeurs seuils préconisées pour une utilisation sur grandes cultures :

	Seuils ANSES pour les grandes cultures
Entérocoques fécaux NPP (par g)	< 10 000
<i>E. coli</i> sur TBX	< 1 000
<i>Clostridium perfringens</i> (végétative) (dans 1 g)	m=100 M=1 000 n=3 c=1*
<i>Clostridium perfringens</i> (spores) (dans 1 g)	m=100 M=1 000 n=3 c=1*
Salmonelles (dans 1 g)	absence
Staphylocoques à coagulase (par g)	< 10
Larves de nématodes (dans 1g)	absence
Oufs de nématodes (dans 1 g)	absence
Pythium	Non détecté

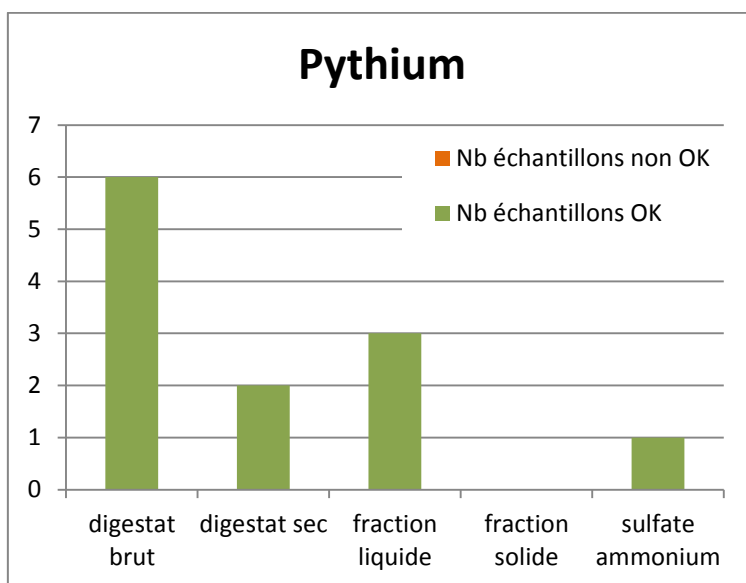
*M = valeur de référence / M = seuil limite d'acceptabilité / n = nombre minimal d'échantillons soumis à l'analyse / c = nombre d'échantillons dont la teneur peut être compris entre m et M

Les seuils préconisés sont liés aux méthodes d'analyses et sont conseillés mais non obligatoire. En cas de dépassement, la demande d'homologation peut malgré tout être faite. Il faut cependant apporter un argumentaire et prévoir des mesures de gestion du risque (délai avant récolte, port d'équipements de sécurité lors de la manipulation).

2. Récapitulatif des résultats par paramètres

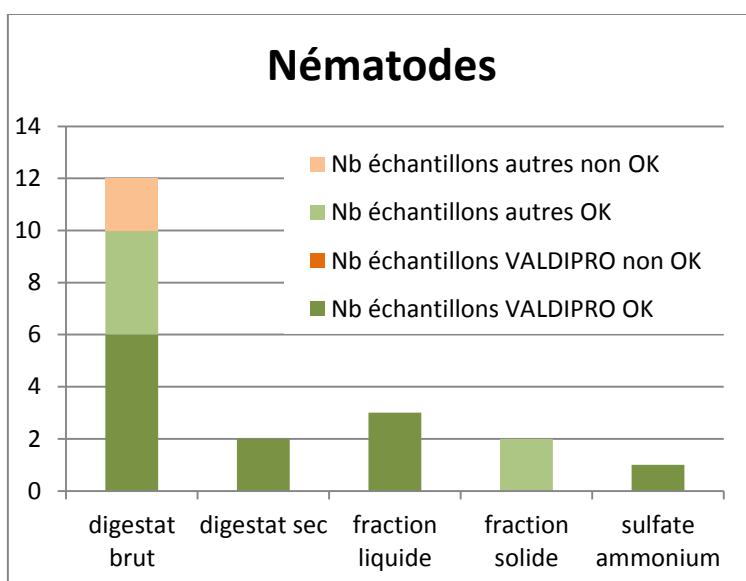
Les résultats obtenus sur les différents paramètres sont donc comparés à ces valeurs guide ANSES.

a. Pythium



Ce champignon phytopathogène n'a pas été retrouvé dans les digestats. Les analyses réalisées sur les déjections animales, autres sous-produits animaux ou déchets grassex n'en ont pas révélé non plus.

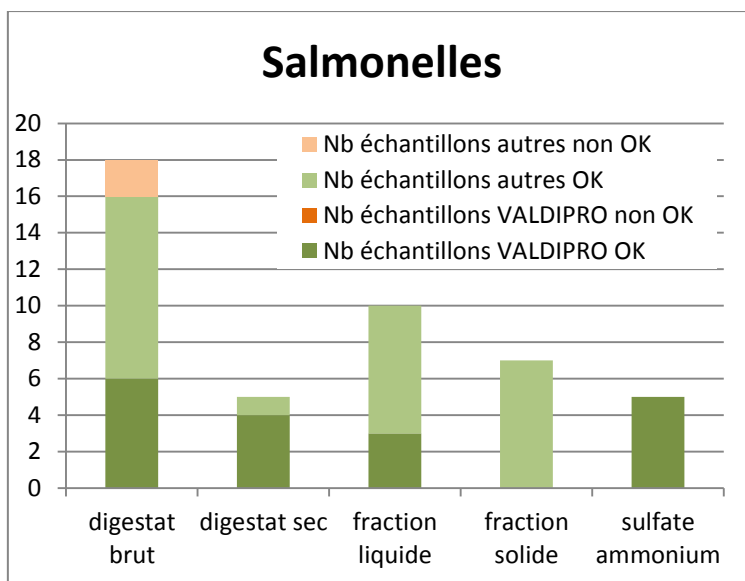
b. Nématodes (larves et œufs)



Sur 20 échantillons de digestat, 2 prélèvements réalisés sur le même site ont indiqué la présence d'œufs de nématodes (dont certaines espèces sont des parasites humains). Il y a également un risque potentiel d'en retrouver dans les substrats (présence dans 3 échantillons sur 8).

La caractérisation de l'espèce est difficile, car peu de laboratoires sont compétents. En cas de détection dans le digestat, il est nécessaire de réaliser plusieurs autres analyses auprès d'un laboratoire spécialisé.

c. Salmonelles

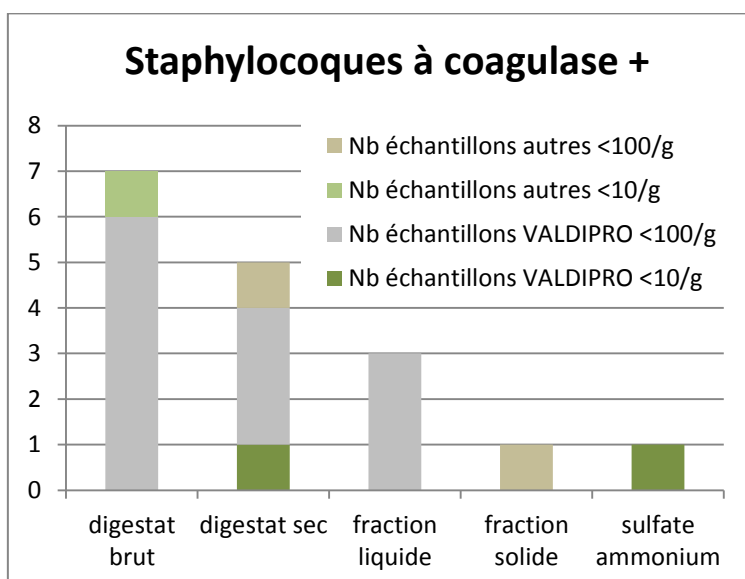


Les salmonelles (bactérie pathogène pour l'homme mais pas pour le porc) ont été retrouvées dans plusieurs échantillons de lisiers porcins (environ 20% des échantillons).

Sur les 45 échantillons de digestat listés ci-dessus, les salmonelles ont été détectées à 2 reprises sur le digestat brut, sur le même site, sur une période de 5 mois. Les analyses réalisées depuis 2 ans sur ce site n'ont pas révélé d'autres détections.

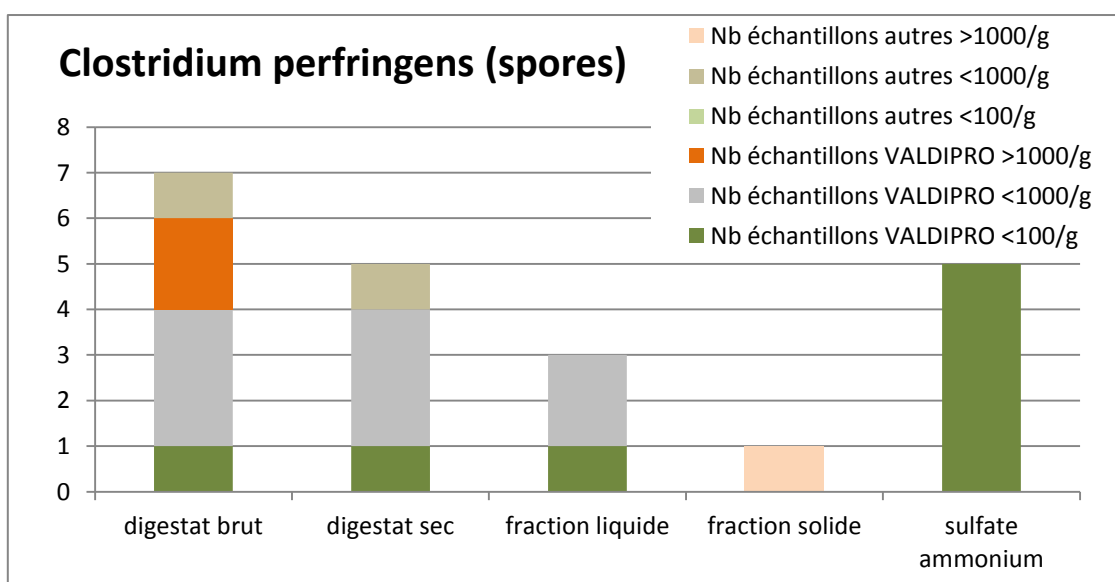
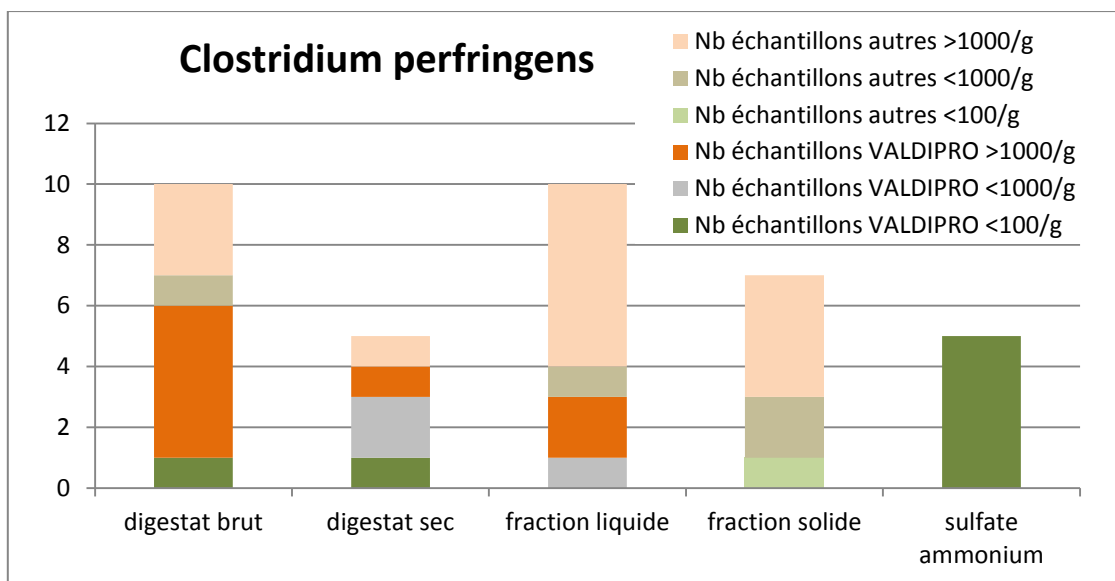
Cela incite malgré tout à prévoir des mesures de gestion, lorsque le digestat n'est pas hygiénisé.

d. Staphylocoques à coagulase positive



L'ensemble des échantillons de digestat présente une teneur inférieure à 100/g pour les staphylocoques à coagulase positive (bactérie potentiellement pathogène pour l'homme). Dans les échantillons de substrats, un échantillon sur 14 présentait une valeur supérieure à 100/g. La valeur référence du guide ANSES est < 10/g, mais cette vérification est souvent difficile à atteindre en raison des protocoles de dilution à appliquer pour suivre la méthode.

e. *Clostridium perfringens*



Près de 60 % des échantillons présentent des teneurs inférieures à 1000/g. Moins de 10% des échantillons dépassent 10^4 .

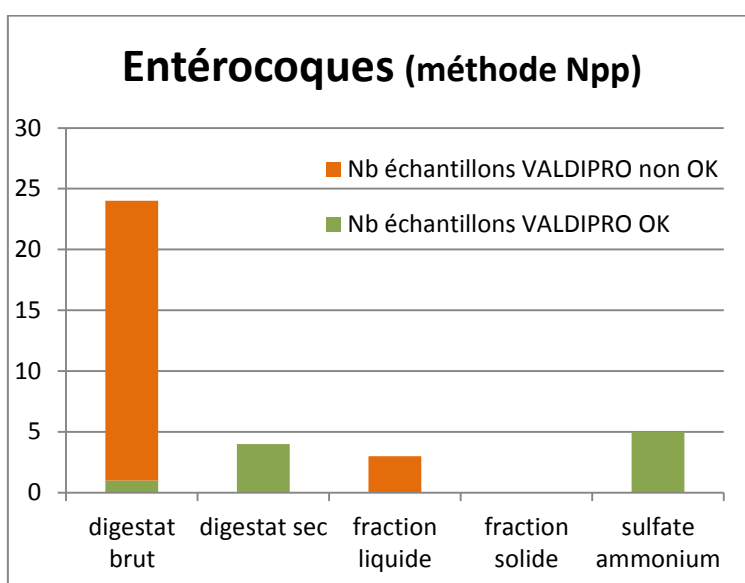
C. perfringens est une bactérie très ubiquitaire largement répandue dans tout l'environnement (sol, sédiments, eaux d'égout, lisiers, cadavres, poussières, surface des végétaux). Elle reste fréquemment présente dans les digestats car les spores de *Clostridium* sont très résistantes à la chaleur. Elle est potentiellement pathogène pour l'homme et utilisée comme indicateur de contamination et de traitement.

L'avis de l'Anses Autosaisine n° « 2008-SA-0257a » consacré à l'évaluation des risques liés à la présence de *Clostridium perfringens* dans les Matières Fertilisantes et les Supports de Culture, donne la conclusion suivante :

« Si la pathogénicité de *Clostridium perfringens* est reconnue, il n'a pas été rapporté dans la littérature consultée de cas mettant en cause des matières fertilisantes ou des déjections animales émises au champ, au contraire d'autres pathogènes (Dorioz et al., 2006). Un tel lien serait de toute façon très difficile à établir étant donné la complexité des causes d'entérotoxémies et l'ubiquité de *C. perfringens*.

Les concentrations habituellement rencontrées dans des déjections animales (10^2 à 10^4 bactéries par gramme) représentent donc un risque faible de contamination par voie orale de l'homme ou de l'animal, dans les usages pris en compte dans le présent document. »

f. Entérocoques

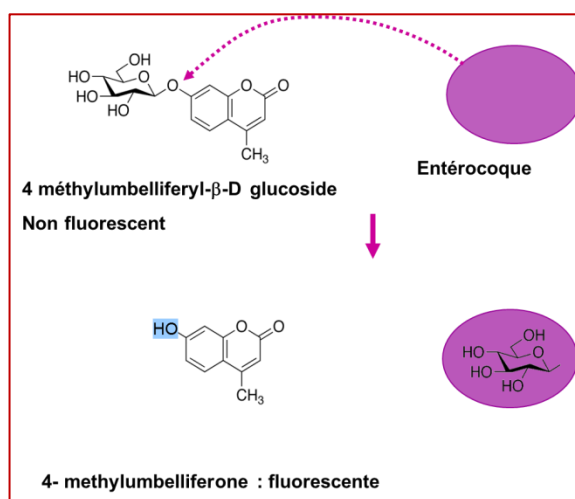


Les entérocoques sont des bactéries faiblement pathogènes pour l'homme. Elles sont communément utilisées comme des indicateurs de contamination fécale ou des indicateurs de traitement. Les résultats montrent un nombre d'échantillons ne satisfaisant pas au seuil préconisé par l'ANSES de 26 (sur 36 échantillons).

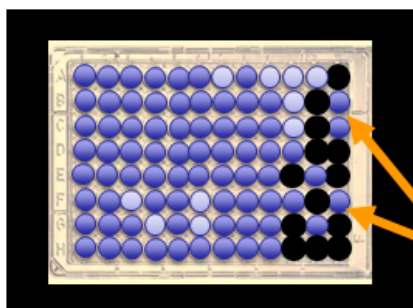
La méthode de dénombrement du guide ANSES NF EN ISO 7899-1 consiste à diluer le produit, puis à le répartir dans des cupules. On ajoute ensuite un substrat supposé spécifique des entérocoques qui provoque une fluorescence en présence des bactéries. On parle alors de bactéries Esculine+. La comparaison entre le nombre de cupules fluorescentes par rapport au nombre de cupulesensemencées donne alors un nombre probable d'entérocoques présentes dans l'échantillon (NPP : nombre le plus probable).

Valdipro

VALorisation des Digestats en tant que PROduits fertilisants



Sur les lisiers de porcs, les composts et les digestats qui ont été beaucoup étudiés à IRSTEA, on a constaté que les entérocoques (méthode npp) étaient très souvent très supérieurs aux *Escherichia Coli* alors que normalement ces deux familles sont présentes en quantités comparables dans les effluents. Il a donc été fait comme hypothèse que la méthode NF EN ISO 7899-1 conduisait à de fréquents faux positifs pour des produits contenant une flore microbienne importante.



1 : fluorescence parasite rendant difficile la lecture

2 : faux positifs: puits fluorescents sans présence d'entérocoques

Anne-Marie Pourcher d'IRSTEA a alors réalisé des analyses des cupules positives NF EN ISO 7899-1 en utilisant le milieu Slanetz. Ces contrôles répétés ont confirmé que la méthode NF EN ISO 7899-1 donnait de nombreux faux positifs, probablement en raison de la présence d'une flore microbienne très diverse et importante. Ces résultats n'ont malheureusement pas été publiés.

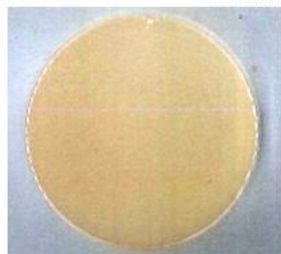
M. Pierre Abasq, microbiologiste au laboratoire INOVALYS (anciennement IDAC) indique également avoir procédé à des tests de confirmation sur milieu spécifique BEA, à partir de cupules positives de microplaques (choisies parmi les dilutions les plus fortes), et n'avoir retrouvé des "Esculine +" que dans 1 cupule sur 10 environ, ce qui va dans le sens de faux positifs.

Sur une matrice digestats, qui ressemble fortement à un lisier, on peut supposer que cette problématique de faux positifs impacte également les résultats. Il a donc été proposé de réaliser une nouvelle campagne d'analyses selon une seconde méthode adaptée aux matières fertilisantes : la méthode Slanetz + BEA.

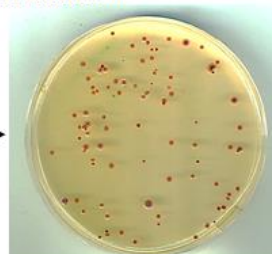
Ensemencement en milieux solides

Sur **Gélose de Slanetz et Bartley**

Dénombrement des « colonies formant unité »



Incubation 48h à 37 ° C



Étalement de 0,1 mL d'une suspension diluée

critère de différenciation :
chlorure de 2-3-5 triphényl-tétrazolium (TTC)

Dénombrement des colonies roses à violettes: réduction du TTC



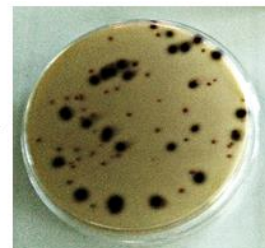
**risque de faux positifs :
colonies rouges, roses ou violettes non entérocoques**



Repiquage des colonies sur milieu BEA (Bile Esculine Azide)



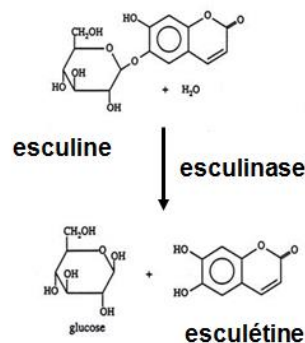
Incubation
2 à 4h à 44 ° C



Colonies noires
(hydrolyse de l'esculine)

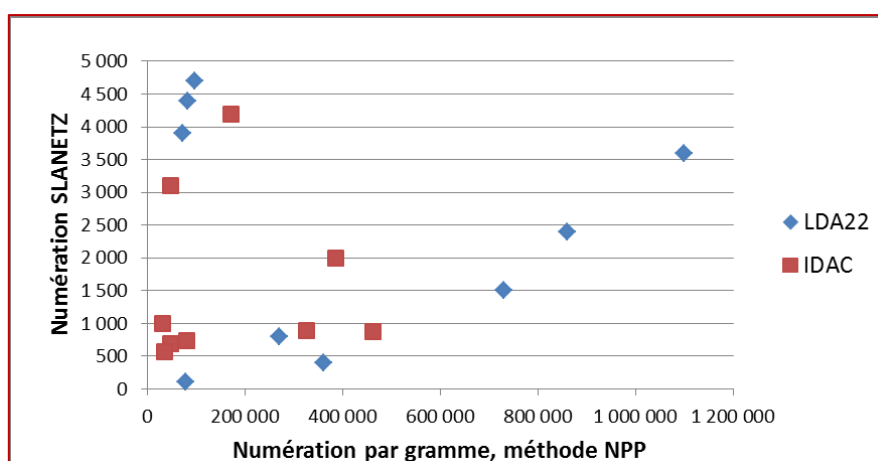
Repiquage de l'ensemble des colonies sur milieu BEA

Pas de faux positifs



Les deux méthodes ont été comparées au sein de 2 laboratoires lors de cette seconde campagne. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Méthode npp		Méthode Slanetz	
	IDAC	LDA22	IDAC	LDA22
D01	385 263	72 000	2 000	3 900
D02	325 931	97 000	890	4 700
D03	462 722	83 000	870	4 400
D04	46 800	360 000	3100	400
D05	170 062	77 000	4200	<400
D06	31 515	270 000	1000	800
D07	46 690	860 000	690	2 400
D08	80 869	730 000	730	1 500
D09	35 332	1 100 000	570	3 600

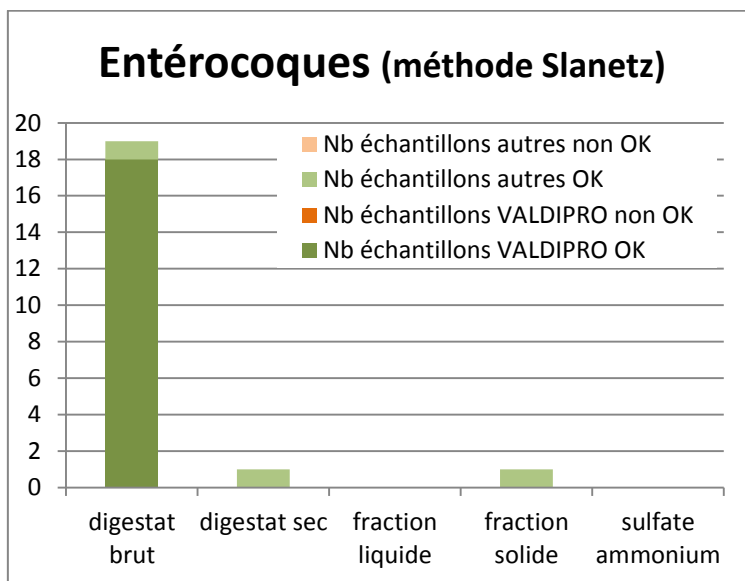


Les résultats constatés montrent une grande variabilité que ce soit pour les triplicats d'un même prélèvement, pour des prélèvements différents et même entre les 2 laboratoires, quelle que soit la méthode utilisée. Cette variabilité peut provenir du mode de prélèvement puis de conservation des échantillons, de l'incertitude des méthodes (estimées généralement à $\pm 50\%$ = $\pm 0,3$ log, voire de $\pm 0,5$ log selon les microorganismes), de l'homogénéité des matrices, voire des pratiques du laboratoire.

Toutefois, l'incertitude de mesure de la méthode NPP est généralement plus élevée que celle des méthodes microbiologiques classiques. On constate qu'il n'y a pas un laboratoire qui surestime ou sous-estime systématiquement les mesures.

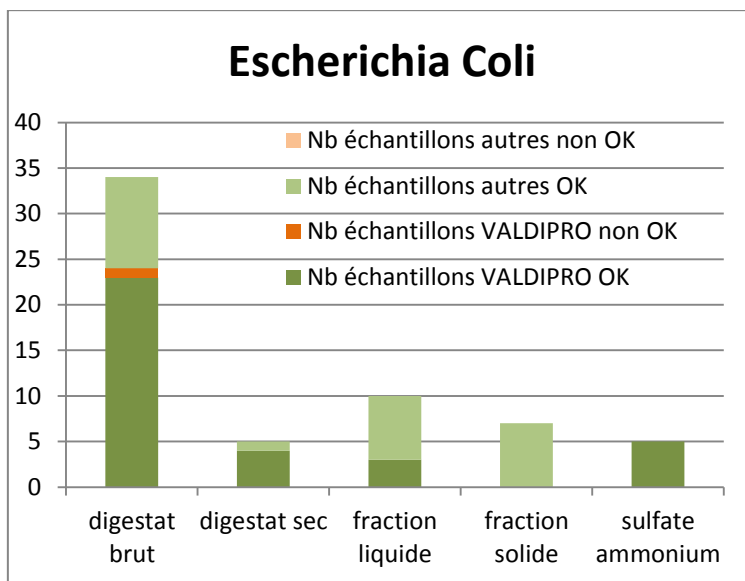
On observe une surestimation systématique de 1,5 à 3 log de la méthode npp par rapport à la méthode Slanetz/BEA, ce qui est conforme aux hypothèses d'IRSTEA. Il n'y a pas de corrélation entre les 2 méthodes ce qui souligne le caractère aléatoire de la différence entre les deux méthodes.

Concernant les dossiers d'homologation, l'ANSES rappelle que la méthode figurant sur le guide est conseillée mais pas obligatoire, et que les pétitionnaires peuvent présenter une autre méthode en l'accompagnant d'un argumentaire et des essais de validation réalisés par les labos (linéarité, répétabilité, reproductibilité).



Sous réserve que la méthode Slanetz soit acceptée, l'ensemble des digestats analysés respecte les valeurs du guide ANSES.

g. Escherichia Coli



Les *E. coli* sont des bactéries fécales dont certaines peuvent être pathogènes pour l'homme. Elles sont communément utilisées comme des indicateurs de contamination fécale ou des indicateurs de traitement.

Sur la soixantaine d'échantillons, seul un dépassement a été observé sur le paramètre *E. Coli*. Il n'a pas été retrouvé depuis sur ce site.

Lors de la première campagne d'analyses VALDIPRO, le paramètre a également été vérifié dans les substrats animaux entrants dans les différentes unités. Un abattement significatif a systématiquement été observé.

CONCLUSION

Si l'on accepte la méthode SLANETZ pour les analyses des entérocoques sur digestats bruts, la qualité microbiologique des digestats est généralement conforme aux valeurs guides ANSES.

L'exception attendue concerne *Clostridium perfringens*, bactérie ubiquiste résistante à la chaleur, qui dépasse fréquemment les 100/g dans les digestats bruts et solides. Cependant seuls 6 échantillons sur 58 dépassent 10^4 /g.

Les écarts (très peu nombreux) constatés sur Salmonelles et *E. Coli* n'ont pas été retrouvés dans les échantillons plus tardifs. Des mesures de gestion des non-conformités sont à prévoir pour les digestats n'ayant pas subis de phase d'hygiénisation.

Rédacteurs :

J. LENCAUCHEZ¹, P. DABERT², AM. POURCHER², S. MERLE¹, A. HAUMONT¹

¹ Aile, 73 rue de St Brieuc, CS 56520, F-35065 Rennes Cedex, France.

² IRSTEA, UR GERE, 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.



Avec la contribution financière du compte d'affection spéciale « développement agricole et rural »

"La responsabilité du ministère en charge de l'agriculture ne saurait être engagée"