

Rapport d'étude

**METHASEQ - ETUDE DU CARACTERE
HYGIENISANT DE DIFFERENTES ETAPES DU
PROCESS DE METHANISATION :**

***Développement et mise en œuvre d'une
démarche analytique de pointe permettant le
suivi de pathogènes d'intérêt réglementaire au
cours de la filière méthanisation***

Juin 2023

INRAE Transfert – Filiale d'INRAE

Siège social : 28, rue du Dr. Finlay – 75015 Paris

Tél. : 33 (0)1 42 75 95 00

contact@metys-inrae-transfert.fr

Site Internet : www.inrae-transfert.fr

Société par Actions Simplifiée au capital de 1 920 000 €

RCS PARIS B 433 960 762

SIRET : 433 960 762 00030

APE 6630ZTVA FR 96 433 960 762

La conception et le pilotage de l'étude ont été menés conjointement par la INRAE et GRDF, par l'intermédiaire d'INRAE Transfert. La coordination et la réalisation de l'étude ont été confiées à INRAE Transfert sous la direction scientifique de Nathalie Wéry (INRAE).

Ont notamment contribué à l'étude et à la rédaction du rapport :

Marina MOLETTA-DENAT (INRAE Transfert), rédactrice,

Olivier AZAM (INRAE Transfert), rédacteur,

Nathalie WERY (INRAE), rédactrice,

Jean-jacques GODON (INRAE), expert scientifique,

Anne-Marie POURCHER (INRAE), expert scientifique,

Anne LEBOUCHER (DGAL), membre du comité de pilotage et expert scientifique,

Adeline HAUMONT (Association AILE), membre du comité de suivi et expert scientifique,

Pascale CHENON (VoxGaia), membre du comité de pilotage,

Laetitia AUBEUT-CHOJNACKI (GRDF), coordinatrice GRDF et membre du comité de pilotage

L'étude, présentée ci-après dans sa version intégrale,



Sommaire

Préambule et approche expérimentale	6
1 Programme de travail	7
2 Rappel sur la méthanisation	8
2.1 Processus.....	8
2.2 Paramètres de suivis.....	9
3 Plan d'échantillonnage et méthodologie d'analyse.....	10
3.1 Description du site de prélèvement Site 1.....	10
3.1. Description du site de prélèvement Site 2.....	11
3.2 Description du site de prélèvement Site 3.....	11
3.3 Description du site de prélèvement Site 4.....	11
3.4 Description du site de prélèvement Site 5.....	12
3.5 Suivi analytique	13
3.5.1 Analyses physico-chimiques.....	13
3.5.2 Analyses microbiologiques.....	14
3.5.2.1 Analyses culturales	14
3.5.2.2 Analyses par les méthodes moléculaires	14
3.5.2.3 Extraction d'ADN.....	15
3.5.2.4 qPCR quantitative.....	15
3.5.2.5 ddPCR quantitative.....	15
3.5.2.6 Séquençage	16
4 Résultats.....	16
4.1 Présentation détaillée de la filière et caractérisation physicochimique	16
4.1.1 Schéma de fonctionnement du site 1	17
4.1.2 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 1	18
4.1.3 Schéma de fonctionnement du site 2	20
4.1.4 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 2	21
4.1.5 Schéma de fonctionnement du site 3	22
4.1.6 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 3	23
4.1.7 Schéma de fonctionnement du site 4	25
4.1.8 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 4	26
4.1.9 Schéma de fonctionnement du site 5	28
4.1.10 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 5	29
4.2 Résultats des analyses microbiologiques	31
4.2.1 Préparation et extraction des ADN	31
4.2.2 Suivi quantitatif des pathogènes d'intérêt dans les 5 sites par les méthodes de cultures	32

4.2.3	Suivi quantitatif et qualitatif des pathogènes d'intérêt dans les 5 sites par méthode moléculaire.....	33
4.2.4	Comparaison des sites sur la base de la diversité bactérienne	40
		42
5	Conclusions et discussion par cibles d'intérêt	44
6	Conclusions et discussion par substrats et procédés	45
7	Conclusions et discussion sur les méthodologies utilisées	46
8	Conclusion générale.....	47
	Liste des tableaux	48
	Annexes	49

Préambule et approche expérimentale

Depuis la mise en place des tarifs d'achat en 2011, la filière française d'injection du biométhane se développe rapidement. On compte à ce jour en France 732 sites de production de biométhane qui injectent sur le réseau, pour une capacité raccordée de 13,8 TWh/an. Plus de 600 projets sont en cours d'instruction ou de montage, pour 15 TWh de capacités d'injection réservées sur les 3 à 4 prochaines années. Cette tendance est amenée à se poursuivre, compte tenu des objectifs politiques de développement de la filière qui prévoit que 20% de la consommation de gaz sera issu du biogaz.

La valorisation agronomique des digestats peut permettre, à certaines conditions, d'améliorer les bilans environnementaux et économiques du secteur agricole. Les digestats peuvent présenter de nombreux intérêts agronomiques : contribuer à la bonne structure et au stock de carbone du sol et fournir les éléments minéraux (azote, potassium et phosphore) aux plantes, (permettant de réduire l'utilisation de fertilisants de synthèse).

Certaines incertitudes demeurent toutefois, notamment sur les conséquences de l'épandage des digestats sur la diversité microbienne des sols, et doivent être évaluées.

Le retour au sol des digestats, des boues de stations de traitement des eaux usées (STEU) et des effluents d'élevage, est indissociable du concept "One health" utilisé pour décrire le principe selon lequel "la santé humaine et la santé animale sont interdépendantes et liées à la santé des écosystèmes dans lesquels elles coexistent". Si l'épandage des digestats ne représente à l'échelle globale qu'une très faible part de la quantité de pathogènes émise dans l'environnement, à l'échelle du territoire, il constitue une voie de dissémination à considérer (Peng et al., 2020). Lors des étapes du processus de méthanisation, les micro-organismes pathogènes peuvent être inactivés sous l'action combinée de facteurs biotiques (prédation, compétition pour le substrat, antibiose) et abiotiques (structure du sol, teneur en eau, température, pH, action des U.V., humidité, teneur en carbone) (Pourcher et al., 2020; Wery, 2016). Les facteurs environnementaux étant difficilement contrôlables, il est important de limiter la dissémination des micro-organismes pathogènes en amont de l'épandage, ce qui nécessite une connaissance des paramètres susceptibles d'influencer la persistance des pathogènes lors de la méthanisation.

En particulier, les SPAN, de par leur origine animale, peuvent générer des risques sanitaires spécifiques et font l'objet d'une réglementation dédiée. Pour les introduire dans une filière méthanisation, il est nécessaire d'obtenir un agrément sanitaire et de faire subir aux SPAN un traitement d'hygiénisation préalablement à leur méthanisation. Ces étapes font porter sur la filière un coût non négligeable, et leur mise en œuvre constitue un levier central de la rentabilité de la filière qu'il est intéressant d'examiner au regard des nouveaux outils d'études des écosystèmes microbiens complexes.

Il existe trois approches permettant de quantifier les micro-organismes pathogènes et les BIET (Bactéries Indicatrices d'Efficacité de Traitement) dans les effluents et les digestats : (i) approche microscopique (utilisée pour la mise en évidence des parasites), (ii) approche culturale sur milieu de culture (bactéries, bactériophages) ou sur culture de cellules de mammifères (virus) (Cui et al., 2023; Flores-Ramírez et al., 2023; Svennevik et al., 2021) et (iii) approche génomique qui quantifie les copies de gènes (utilisées pour les bactéries, les virus ou les parasites) (Svennevik et al., 2021). Cependant, les protocoles de mise en culture "classiques", appliqués dans la réglementation actuelle peuvent conduire à des sous-estimations lorsque les stress environnementaux induisent chez la cellule bactérienne, pourtant viable, une perte de la capacité à se multiplier sur le milieu de culture habituellement utilisé (Flores-Ramírez et al., 2023). Les outils moléculaires, basés sur la détection, la quantification et l'identification de l'ADN microbiens, permettent de s'affranchir de ces biais et sont depuis 2005 appliqués dans certains protocoles réglementaires.

Toutefois, les analyses moléculaires actuelles (qPCR et métagénomique ciblée) appliquées à la méthanisation se heurtent à une limite de détection/quantification trop haute et un manque de spécificité de l'identification microbienne indispensable dans le cadre du suivi des pathogènes dans les écosystèmes complexes. Ces dernières années, de nouveaux outils moléculaires ont été développés (de Vries et al., 2023; Grohmann et al., 2018; Kougias et al., 2018; Li et al., 2018). En effet, la Digital PCR et le séquençage Shotgun (métagénomique totale) sont aujourd'hui facilement accessibles pour étudier les écosystèmes microbiens complexes et peuvent permettre de résoudre les verrous technologiques actuels de l'étude de la dynamique des microflore indésirables dans la filière méthanisation d'élevage (Kim et al., 2014, 2015; Kougias et al., 2018; Svennevik et al., 2021; Wan et al., 2018).

GRDF et l'Etat français ont signé un contrat de service public abordant notamment le sujet de la filière biométhanisation. Selon les projections à l'horizon 2050, cette filière devrait se développer de plus en plus.

Dans ce cadre, GRDF initie des projets impliquant les laboratoires de recherche et notamment INRAE (signature d'un accord cadre INRAE – GRDF en date du 21/02/2018) sur l'ensemble de la filière afin de produire des études et de caractériser l'ensemble du processus de méthanisation : depuis l'entrée dans le digesteur jusqu'au retour éventuel au sol des produits de sortie.

Dans ce contexte, GRDF et INRAE ont signé le 21/02/2018 un accord cadre dans le but de favoriser le développement des relations partenariales entre INRAE et GRDF dans les domaines suivants :

- Une meilleure compréhension et l'amélioration du processus de digestion anaérobie (méthanisation) notamment via la caractérisation des ressources, les prétraitements et les procédés.
- L'accompagnement de la filière de méthanisation pour valoriser le digestat grâce à des études d'impacts environnementaux.
- L'insertion de la méthanisation dans les pratiques agricoles et notamment l'accompagnement de la filière agricole pour le développement de cultures intermédiaires (CIMS et CIVE) avec la quantification des impacts sur l'environnement.

Plusieurs projets et actions de collaboration ont été mis en place dans le cadre de cet accord cadre et sont actuellement en cours.

Dans ce contexte, le projet de recherche vise à étudier le caractère hygiénisant de différentes étapes du processus de méthanisation par le développement et la mise en œuvre d'une démarche analytique de pointe permettant le suivi de pathogènes d'intérêt réglementaire au cours de la filière méthanisation.

En particulier, le projet vise à :

- étudier le devenir de pathogènes d'intérêt sur la base de la réglementation sur les matières fertilisantes et le CDC DigAgri, actuellement inaccessibles avec les outils standards, et de mesurer les abattements.
- définir une démarche analytique qui repose sur des analyses réglementaires (par culture) et des analyses basées sur des nouveaux outils moléculaires de pointe tels que le Deep Shotgun et la digital droplet PCR permettant de diminuer les seuils de sensibilité analytique, actuellement bloquants pour adresser ces questions.
- disposer pour l'avenir d'une démarche analytique et de données (séquences et ADN) permettant d'adresser de nouvelles questions compatibles (autres cibles, antibiorésistances) avec des analyses de routine (ddPCR).

1 Programme de travail

En accord avec les éleveurs-méthaniseurs participant au projet MethaSeq, les cinq sites sélectionnés ont une notation anonyme (M1, M2, M3, M4, M5). Leur localisation n'est pas précisée dans le rapport.

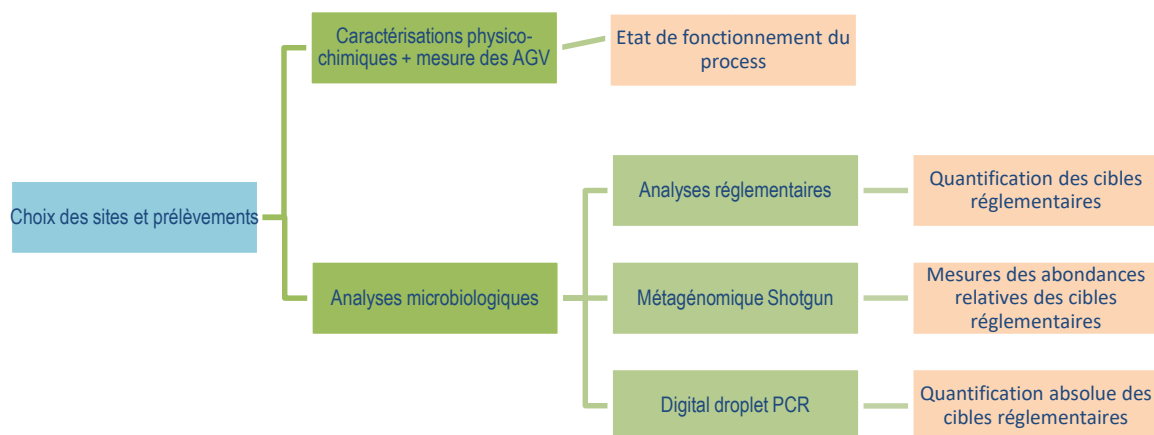


Figure 1 : Description des tâches du projet MethaSeq

2 Rappel sur la méthanisation

La méthanisation est un processus biologique de décomposition de la matière organique par des microorganismes en absence d'air et en condition contrôlée. C'est une fermentation anaérobie (contrairement au compostage qui est une réaction aérobie). La dégradation de la matière organique aboutit à la production d'un produit humide riche en matière organique partiellement stabilisée appelé digestat mais également d'un biogaz qui est majoritairement composé de méthane CH₄ (50 à 70%) et de CO₂ (20 à 50%). Il contient également de l'hydrogène sulfuré H₂S et de la vapeur d'eau. Le biogaz peut, une fois transformé, être utilisé comme source de chaleur et d'électricité. Cette transformation naturelle se réalise dans tous les milieux où l'on trouve de la matière organique en absence d'oxygène comme les marais, ou encore dans les rizières.

La digestion anaérobie permet le traitement de nombreuses sources de pollutions mais plus favorablement 4 secteurs sont concernés : (1) agricole, (2) industriel, (3) déchets ménagers, (4) boues urbaines.

2.1 Processus

La méthanisation est un processus biologique de transformation de la matière organique se déroulant en quatre phases :

- L'hydrolyse : cette étape généralement lente consiste à transformer la matière organique complexe comme les polysaccharides, les lipides et les protéines en simple composé (monosaccharides, acides gras, acide aminés...)
- L'acidogénèse : les monomères issus de l'étape précédente sont convertis en acides gras volatils (acétique, propionique) et en alcool (méthanol, éthanol). Au cours de cette étape, qui est 30 à 40 fois plus rapide que l'étape d'hydrolyse, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène sont produit due à l'élimination des macromolécules organiques.
- L'acétogénèse : l'étape d'acétogénèse permet la transformation des différents composés issus de la phase d'acidogénèse en acétate, en hydrogène et en gaz carbonique grâce à des bactéries acétogènes.
- La méthanogénèse : cette étape lente permet de produire du méthane à partir des produits formés lors de l'acétogénèse.

Les différentes étapes du processus de la méthanisation sont représentées dans la figure suivante.

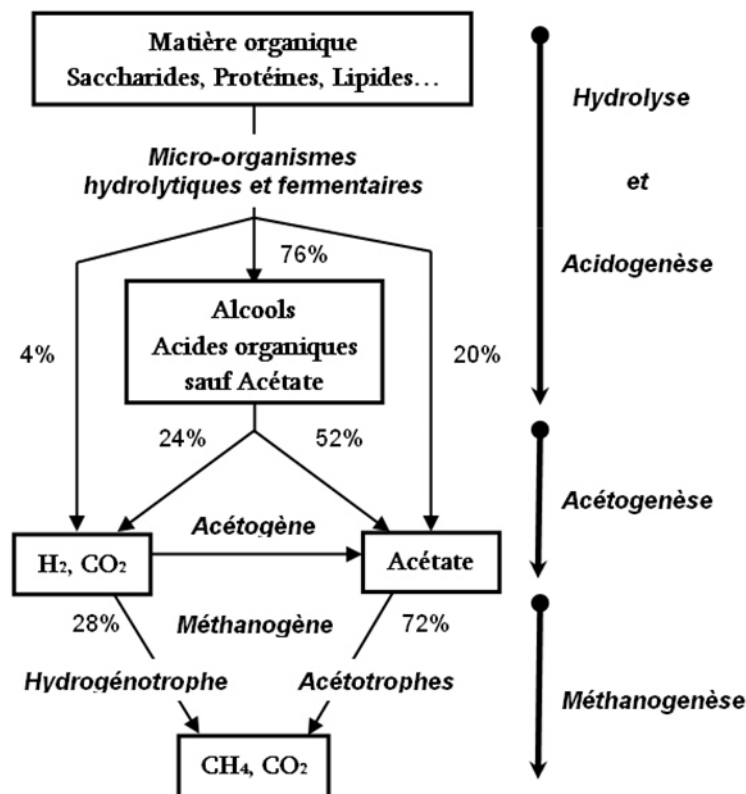


Figure 2: Schéma illustrant les différentes étapes du procédé de méthanisation

2.2 Paramètres de suivis

Comme tout procédé biologique, la digestion anaérobie est sensible à différents paramètres qui peuvent modifier la stabilité du processus mais également la vitesse de production de biogaz :

- La DCO : La Demande Chimique en Oxygène correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder, par voie chimique, toute la matière organique d'un composé chimique. Elle s'exprime en milligrammes d'oxygène par litre. Il existe deux mesures de DCO :
 - La DCO soluble qui est mesurée sur le surnageant d'un échantillon après centrifugation et filtration.
 - La DCO totale mesurée sur un échantillon brut.

La composition et débit du biogaz : Ces deux paramètres donnent une indication sur le fonctionnement global du digesteur. En effet, ces derniers permettent de suivre l'état de fonctionnement du réacteur et du processus de méthanisation. Pour que l'exploitation de l'unité de méthanisation soit optimale il est nécessaire que le biogaz majoritairement composé de méthane CH_4 et de CO_2 ait une prédominance en méthane (50 à 70%). Par la suite, le biogaz produit pourra être valorisé. Le suivi qualitatif et quantitatif de la production de biogaz permet l'évaluation et l'optimisation du procédé de méthanisation.

- Les AGV : Les Acides Gras Volatils sont les intermédiaires les plus importants de la digestion anaérobie. Ces derniers sont produits lors de l'hydrolyse de la matière organique. Les principales espèces d'AGV sont les acides :

- Acétique
- Propionique

- Butyrique
- Iso-butyrique
- Valérique
- Iso-valérique

Leur accumulation dans le digesteur traduit un dysfonctionnement de la méthanisation qui s'accompagne d'une baisse du pH et d'une augmentation de la concentration en hydrogène pouvant mener à une inhibition de la méthanogénèse

- **NH₄⁺** : L'azote ammoniacal est indispensable aux métabolismes microbiens et stimule l'activité méthanogène. Cependant, au cours du processus de méthanisation, une partie de l'azote ammoniacal peut être transformé en azote minéral (NH₄⁺ /NH₃). En fonction de pH mais aussi de la température, la répartition NH₄⁺ /NH₃ évolue comme l'illustre la figure ci-dessous. Le NH₃ est toxique pour la flore méthanogène. Le NH₄⁺ peut devenir un inhibiteur de l'étape de méthanogénèse en présence d'une concentration en AGV importante et ainsi provoquer la faillite totale du digesteur. La concentration en NH₄⁺ dans le réacteur a tendance à augmenter au cours du temps, il faut donc suivre attentivement son évolution.
- **S total** : Soufre Total. Dans le processus de méthanisation la transformation du S total contenu dans le substrat est transformé en H₂S au risque de réduire les performances du processus biologique si la concentration de S total contenu dans l'alimentation du digesteur est trop forte.
- **La température** : La température de fonctionnement d'un digesteur est un paramètre important de la méthanisation car elle influence les performances et la stabilité du réacteur. A l'échelle industrielle, deux fonctionnements sont utilisés :
 - Fonctionnement en mode mésophile (35 à 42°C) : c'est le mode de fonctionnement le plus courant dans l'industrie. Il assure une vitesse constante et une bonne stabilité de la digestion anaérobie.
 - Fonctionnement en mode thermophile (50°C à 57°C) : Ce mode de fonctionnement peut présenter pour certain substrat l'avantage de réduire le temps nécessaire à la dégradation des gisements et par conséquent de diminuer la taille des installations.

3 Plan d'échantillonnage et méthodologie d'analyse

Le plan d'échantillonnage a été construit afin de disposer de tous les compartiments d'une filière de méthanisation en ciblant quatre filières mésophiles dont l'une possède un pré-traitement par pasteurisation et une filière thermophile. Un échantillonnage a été réalisé directement sur site par les opérateurs des unités de traitement sur place. Chaque échantillon a fait l'objet d'un prélèvement ponctuel directement au niveau des cuves souhaitées et stockage en récipient neuf. Pour chaque échantillon le volume prélevé a été de 10 litres. Les rapatriements des contenants vers le laboratoire INRAE de Narbonne a pu être réalisé en transport rapide (non réfrigéré) dans un délai inférieur à 24 heures. Le jour même de la réception dans notre laboratoire un aliquotage et un envoi vers le laboratoire sous-traitant LABOCEA a été réalisé pour analyses réglementaires sur les pathogènes.

3.1 Description du site de prélèvement Site 1

Type de substrat traité	Etape de traitement			
Gisement	Cuve Tampon	Digesteur	Post Digesteur	Stockage digestat
7834 Tonnes				
Effluent d'élevage 69,2%				
Résidus végétaux agricoles 9,6%	30°C à 32 °C	52°C	47°C	Température ambiante
Cultures intermédiaires 17,9%				
Déchets IAA 3,4%,				

3.1. Description du site de prélèvement Site 2

Type de substrat traité	Etape de traitement				
Gisement	alimentation	Digesteur	Post Digesteur 1	Post Digesteur 2	Stockage digestat
22 000 Tonnes Lisier de porc 9000 m ³ Lisier de vache 5000 m ³ Fumier de vache 1000 tonnes Céréales 6000 Tonnes	Alimentation des phases liquides et solides séparées	42°C	42°C	42°C	Séparation de phase

3.2 Description du site de prélèvement Site 3

Type de substrat traité	Etape de traitement			
Gisement	Cuve Préfosse mélange	Digesteur	Post Digesteur	Stockage digestat
9140 Tonnes Déchets verts 10% Lisier 50% Fumier 10% Biodéchets 10% Biodéchets 20 % déconditionnés	30°C à 32 °C	40°C	40°C	Séparation de phase

3.3 Description du site de prélèvement Site 4

Type de substrat traité	paramètres			
Gisement	Réception	Digesteur	Post Digesteur	Stockage digestat
6000 Tonnes Mélange fumier + lisier 96% o-substrats (déchet de blé, déchet de silo, ensilage de maïs, issus de céréales, pommes, marc de raisin) 4%	Alimentation séparée substrats solides et liquides	42°C	42°C	Séparation de phase

3.4 Description du site de prélèvement Site 5

Un traitement thermique est effectué entre les cuve tampon et hydrolyse de 70°C pendant 1h.

Type de substrat traité	Etape de traitement			
	Cuve Tampon	Cuve Hydrolyse	Digesteur	Post digesteur
4000 Tonnes / an Déchets de grandes surfaces, invendus de supermarchés conditionnés et non conditionnés (viandes, légumes, fruits.)				
2700 Tonnes Déchets de cantines (restes de préparation, de plats cuisinés)	T° ambiante	40°C à 42°C	37°C	37°C
1300 Tonnes				

3.5 Suivi analytique

3.5.1 Analyses physico-chimiques

Pour chaque échantillon les analyses physicochimiques présentées ci-dessous ont été réalisées par le laboratoire accrédité LABOCEA22 selon les normes détaillées dans le Tableau 1.

Tableau 1 Liste des mesures et méthodes physico-chimiques

Cibles	Unité	Normes
Paramètre	unité ⁽¹⁾	technique / méthode
Humidité	%	CSOL-MO-0030
Matière sèche	%	CSOL-MO-0030
Matière Minérale	%	NF EN 13039 par calcination
Matière organique	%	NF EN 13039 par calcination
Titre Alcalimétrique Complet (TAC)	g(CaCO ₃)/L	Volumétrie
pH	unité pH	Extraction et mesure
Rapport MV/MS	%	
Azote Total	% N	NF EN 13654-1 (Kjeldahl modifié)
Azote Ammoniacal	% N	Alcalinisation, Distillation puis Titration
Phosphore Total	% P ₂ O ₅	ICP selon NF EN ISO 11885
Potassium	% K ₂ O	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	% SO ₃	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	% S	ICP selon NF EN ISO 11885
Acides gras volatils (AGV) :		AGV CPG / INRAE
Acétate	g.L-1	AGV CPG - C2
Propionate	g.L-1	AGV CPG - C3
Iso-butyrate	g.L-1	AGV CPG - IC4
Butyrate	g.L-1	AGV CPG - C4
Iso-valérate	g.L-1	AGV CPG - IC5
Valérate	g.L-1	AGV CPG - C5
AGV totaux eq. Acétate	gC2eq.L-1	AGV eq. C2 /calcul
AGV totaux eq. DCO	g.L-1	AGV eq. DCO /calcul

3.5.2 Analyses microbiologiques

3.5.2.1 Analyses culturales

Les analyses réglementaires ont été réalisées par le laboratoire accrédité LABOCEA22 selon les normes détaillées dans le Tableau 2.

Tableau 2 Cibles et Normes réglementaires appliquées

Cibles	Unité	Normes
<i>Staphylocoques coagulase +</i>	UFC/g	NF EN ISO 6888-2
<i>Clostridium perfringens</i>	UFC/g	NF EN ISO 7937
<i>Listeria monocytogenes</i>	UFC/g	NF EN ISO 11290-2
<i>Entérocoques</i>	UFC/g	Méthode interne sur milieu Slanetz 48h à 37°C - Confirmation sur BEA
<i>Salmonella spp.</i>	NPP/g	NF EN ISO 6579-1
<i>Escherichia coli</i>	UFC/g	NF EN ISO 16649-2

3.5.2.2 Analyses par les méthodes moléculaires

La présence de 5 cibles réglementaires a été analysée par les outils moléculaires. Les données qualitatives (Deep Shotgun (DeepSG)) et quantitative (ddPCR) ont été produites à partir des échantillons sélectionnés dans le plan d'échantillonnage (Tableau 3), l'objectif étant d'apporter des connaissances sur la dynamique des espèces cibles dans les filières de méthanisation. Il convient de souligner que parmi, les bactéries ciblées, *Enterococcus spp.* et *E. coli* ne sont pas considérés comme des pathogènes mais comme des BIET.

Tableau 3 : Plan d'échantillonnage des analyses microbiologiques

Cibles réglementaires	Méthodes par culture (sous-traitance Labocea22)	ddPCR	Séquençage Deep Shotgun
<i>Escherichia coli</i>	X	X	X
<i>Enterococcus spp.</i>	X	X	X
<i>Salmonella spp.</i>	X	X	X
<i>Listeria monocytogenes</i>	X	X	X
<i>Clostridium perfringens</i>	X	X	X
<i>Staphylococcus aureus</i>	X		X

Cibles d'intérêt d'après l'état de l'art	Méthodes par culture (sous-traitance Labocea22)	ddPCR	Séquençage Deep Shotgun
<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>			X
<i>Clostridium botulinum</i>			X

Afin d'étudier la diversité bactérienne sur les 5 sites, les mesures suivantes ont été réalisées.

- Quantification de la flore bactérienne totale qPCR (ARNr 16S),
- Quantification des 5 cibles réglementaires par ddPCR
- Recherche de 5 cibles réglementaires et 2 cibles de la bibliographie par séquençage Deep Shotgun Illumina et analyses bio-informatiques.

3.5.2.3 Extraction d'ADN

L'extraction des acides nucléiques est réalisée par le LBE (INRAE) en suivant un protocole développé par l'INRAE en triplicat à partir de 10g de matière brute pour un volume de matrice ADN final de 3 x 5 mL. Les contrôles qualité de l'ADN ont été effectués par NanoQuant (Qualité et Quantité). Par la suite, les 3 x 5mL d'ADN ont été concentrés par ultrafiltration dans des tubes Amicon Ultra 15mL 30kDa pour obtenir 250 µL d'éluat hautement concentré en ADN. Cet éluat a été purifié et concentré à nouveau par microbilles Ampure. Les contrôles qualité de l'ADN ont été effectués par NanoQuant (Qualité et Quantité) et par Qubit (Quantité). L'intégrité et la longueur des ADN ont été mesurées par Fragment analyzer.

3.5.2.4 qPCR quantitative

La qPCR a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques, en triplicat, et selon 2 dilutions. Le mélange réactionnel se composait de 6 µl de SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 200 nM de chaque amorce (Forward : 5'- ACGGTCCAGACTCCTACGGG -3' , Reverse : 5'- TTACCGCGGCTGCTGGCAC -3'), 2µL d'eau DNase/RNase-free pour 2µL d'ADN. L'amplification et la détection ont été réalisées avec le QuantStudio 6 Flex (APPLIED BIOSYSTEMS) avec les paramètres de cycle suivants : 95°C pendant 2 min, et 40 cycles de 95°C pendant 10 sec, 61°C pendant 60 sec. Le programme QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 (APPLIED BIOSYSTEMS) a été utilisé pour calculer la quantité de bactéries totales (nombre de copies du gène par réaction). La courbe standard a été établie ici avec 3 replicats et en utilisant 7 quantités connues d'un ADN synthétique de 225 pb. Elles présentent de bonnes performances avec une efficacité supérieure à 98,2% et un $R^2 > 0,998$ pour l'ensemble des runs.

3.5.2.5 ddPCR quantitative

La ddPCR est réalisée avec l'appareil QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad), disponible sur la plateforme GeT-Santé, Toulouse, selon les recommandations du fournisseur. Le mix final de 22 µl est composé de 7,5 µl d'ADN, 11 µl de 2X ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad), 1,98 µl d'une solution contenant les primers Forward et Reverse à 10 µM, 1,1 µl d'une solution contenant la sonde FAM à 5 µM et 0.42 µL d'eau nuclease free.

20 µl de ce mix sont utilisés pour générer les gouttelettes avec le QX200 AutoDG Droplet Generator (Biorad). La solution de gouttelettes est immédiatement transférée dans une plaque 96 et la PCR est réalisée dans le thermocycler T100 Touch (Biorad) avec le programme suivant : 10 min à 95°C, 40 cycles de 30 s à 94°C et 60 s à 59°C puis une élévation finale de 10 min à 98°C avec une rampe de 2°C/s.

Après la PCR, chaque puits est analysé par le QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) et les données sont récupérées et traitées avec le logiciel QuantaSoft V1.7 (Bio-Rad). La mesure est validée pour une quantité de gouttelettes par puits supérieures à 20000. La limite de détection est fixée à 2 gouttelettes positives par puits et la limite de quantification à 10 gouttelettes positives par puits. Les limites de détection sont de 0,2 et 2 copies de gènes par g de matière fraîche et les limites de quantifications sont de 1,1 à 11,1 copies de gènes par g de matière fraîche. Un contrôle positif (ADN de la cible) et un contrôle négatif NTC (pas d'ADN) ont été réalisés pour chaque plaque analysée.

Cinq systèmes ont été mis en œuvre :

Cible	Gène	Publication
<i>Escherichia coli</i>	<i>uidA</i>	(Frahm et Obst, 2003)
<i>Enterococcus</i> spp.	ARNr 23S	(Frahm et Obst, 2003)
<i>Salmonella enterica</i>	<i>invA</i>	(Hoorfar et al, 2000)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	(Karin et al., 2000)
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpn60</i>	(Dumonceaux et al., 2006)

3.5.2.6 Séquençage

La préparation des bibliothèques permet de réaliser le pool des échantillons qui seront ensuite séquencés sur NovaSeq (Illumina). Les données de séquence ont été générées sur une ligne SP et une ligne S4 du séquenceur Illumina Novaseq6000. Plusieurs contrôles de qualité des bibliothèques sont effectués et permettent de valider la réalisation de celles-ci. Les données brutes issues du séquenceur ont été converties en FASTQ et démultiplexées grâce au logiciel bcl2fastq v2.20.0.422. Pour retirer les adaptateurs de séquençage, l'outil cutadapt v2.10 a été utilisé. Puis nous avons fait tourner fastp v0.21.0 pour réaliser un filtre de qualité des séquences. Enfin le rééchantillonnage a été réalisé de façon aléatoire avec l'outil seqtk v1.3-r106 avec une valeur minimale de 50 millions de couples de séquences. Le détail des QC de séquençage est donné en annexe

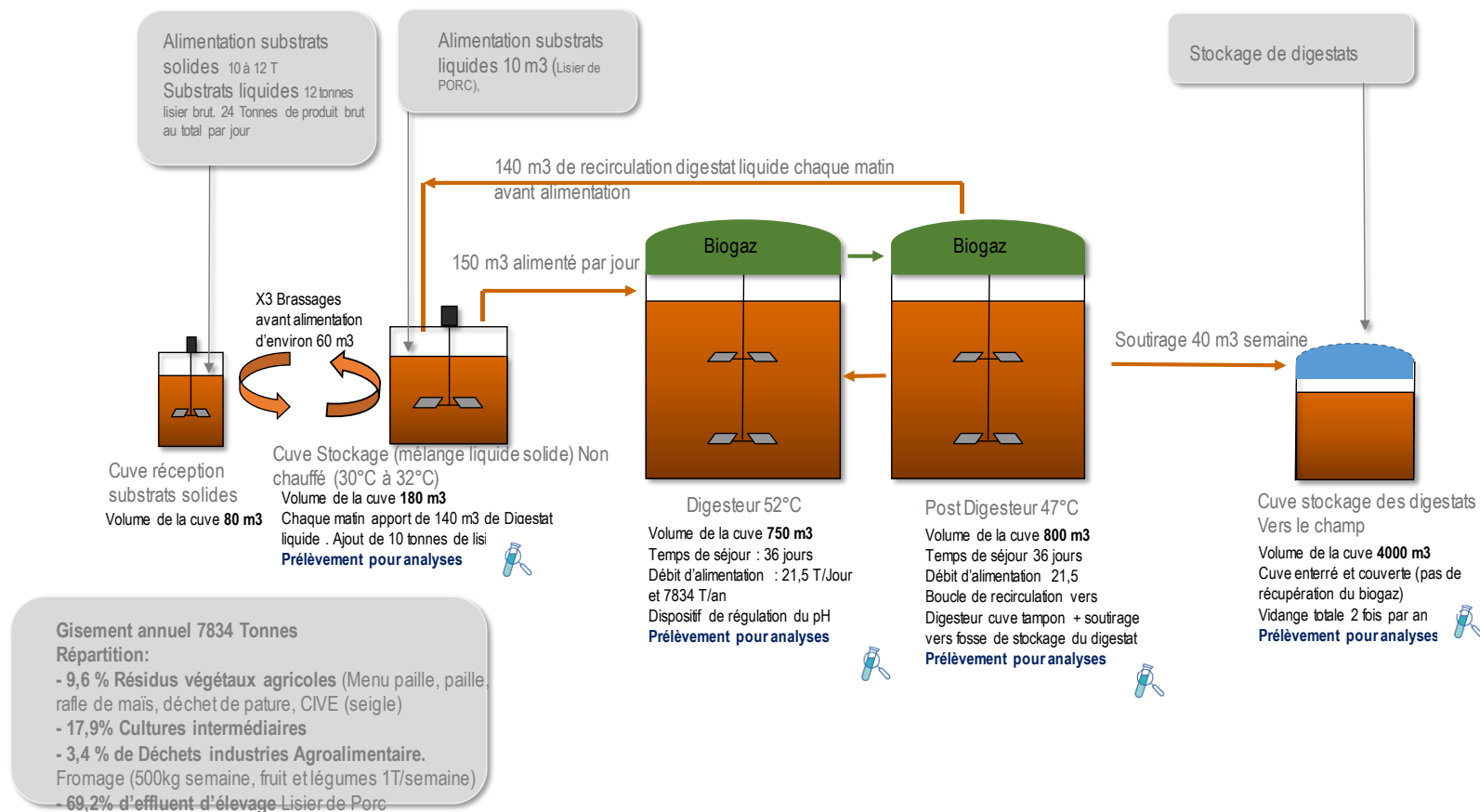
Le pipeline d'affiliation automatique a été réalisé en interne avec le gestionnaire Nextflow v21.10.6. Il comprend les étapes d'affiliation par Kraken v2.1.2, puis d'estimation de l'abondance par Bracken v2.7. La base de données utilisée est issue de la NT NCBI de Février 2020. Enfin le traitement et la visualisation des résultats sont réalisés avec R v3.6.2.

4 Résultats

4.1 Présentation détaillée de la filière et caractérisation physicochimique

En complément des analyses microbiologiques des mesures de caractérisations physicochimiques ont été réalisées pour chacun des 5 sites sélectionnés afin de dresser un état de fonctionnement biologique des différentes étapes de traitement.

4.1.1 Schéma de fonctionnement du site 1



4.1.2 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 1

Tableau 4 : Caractérisation physicochimique de l'unité de traitement du site 1

	Cuve Stockage (mélange)	Digesteur	Post Digesteur	cuve stockage digestat		
Paramètre	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	unité ⁽¹⁾	technique / méthode
Humidité	89,6	90,3	91,2	91,1	%	CSOL-MO-0030
Matière sèche	10,4	9,7	8,8	8,9	%	CSOL-MO-0030
Matière Minérale	2,6	2,5	2,4	2,5	%	NF EN 13039 par calcination
Matière organique	7,8	7,2	6,4	6,4	%	NF EN 13039 par calcination
Carbone Organique Total (COT)	4,5	4,1	3,7	3,7	%	CSOL-MO-0091
pH	7,92	7,8	7,9	7,9	unité pH	Extraction et mesure
Rapport MV/MS	75,00%	74,23%	72,73%	71,91%		0
Titre Alcalimétrique Complet (TAC)				8,1		
Azote Total	0,57	0,57	0,58	0,57	% N	NF EN 13654-1 (Kjeldahl modifié)
Azote Ammoniacal	0,307	0,322	0,33	0,34	% N	Alcalinisation, Distillation puis Titration
Phosphore Total	0,21	0,21	0,2	0,2	% P2O5	ICP selon NF EN ISO 11885
Potassium	0,76	0,75	0,76	0,75	% K2O	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	0,09	0,09	0,09	0,09	% SO3	ICP selon NF EN ISO 11885
Acides gras volatils (AGV) :						AGV CPG / INRAE
Acétate	4,529	0,955	0,363	0,38	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₂
Propionate	0,651	0,287	0,013	0,016	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₃
Iso-butyrate	0,149	0,026	0	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₄
Butyrate	0,373	0,004	0	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₄
Iso-valérate	0,124	0,14	0,51	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₅
Valérate	0,026	0	0,219	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₅
AGV totaux eq. Acétate	5,501	1,216	0,802	0,393	gC2eq.L ⁻¹	AGV eq. C2 /calcul
AGV totaux eq. DCO	7,071	1,536	1,893	0,43	g.L ⁻¹	AGV eq. DCO /calcul
E. coli	25000	<100	<100	<100	UFC/g	NF ISO 16649-2
(*) Staphylocoques coagulase +	<100	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 6888-2
(*) Clostridium perfringens	250	350	880	1100	UFC/g	NF EN ISO 7937
Listeria monocytogenes	<100	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 11290-2
Entérocoques	1200	<100	<100	<100	UFC/g	Slanetz + BEA

NE : nombre estimé, prend en compte l'estimation des petits nombres

N' : nombre calculé à partir de la dernière dilution ensemencée

L'ensemble des analyses physicochimiques mesurées sur le site 1 et à différentes étapes du processus indiquent que la chaîne de traitement était fonctionnelle lors de la campagne d'échantillonnage et que le processus biologique ne présentait pas de dysfonctionnement particulier. Des points remarquables sont tout de même à noter pour chacune des étapes à savoir :

Cuve stockage mélange : Le rapport MV/MS de 75% indique que le produit à dégrader présente une bonne concentration en matière organique potentiellement accessible par les micro-organismes. La concentration en azote mesurée est de 5,7 g.L⁻¹ de N total ce qui est cohérent avec ce type de gisement organique agricole.

La concentration en AGV reste élevée dans cette première cuve 5,5 g.L⁻¹ cependant l'activité hydraulique dans cette cuve ne semble pas significative probablement liée au TSH (Temps de Séjour hydraulique) trop faible. Le pH supérieur à 7 est un bon indicateur du fonctionnement stable pour cette première étape.

Digesteur et Post digesteur : Le rapport NH₄⁺/NTK reste identique dans les trois étapes de traitement (Tampon, digesteur, Post digesteur). Cette observation indique qu'il y a peu d'évolution de la minéralisation de l'azote NTK entre ces 3 compartiments. Le pH mesuré voisin de 8 est dans la fourchette d'une valeur attendue pour ce type de procédé, à savoir que pour un fonctionnement optimal la valeur de pH doit être comprise entre 6,5 et 8,5.

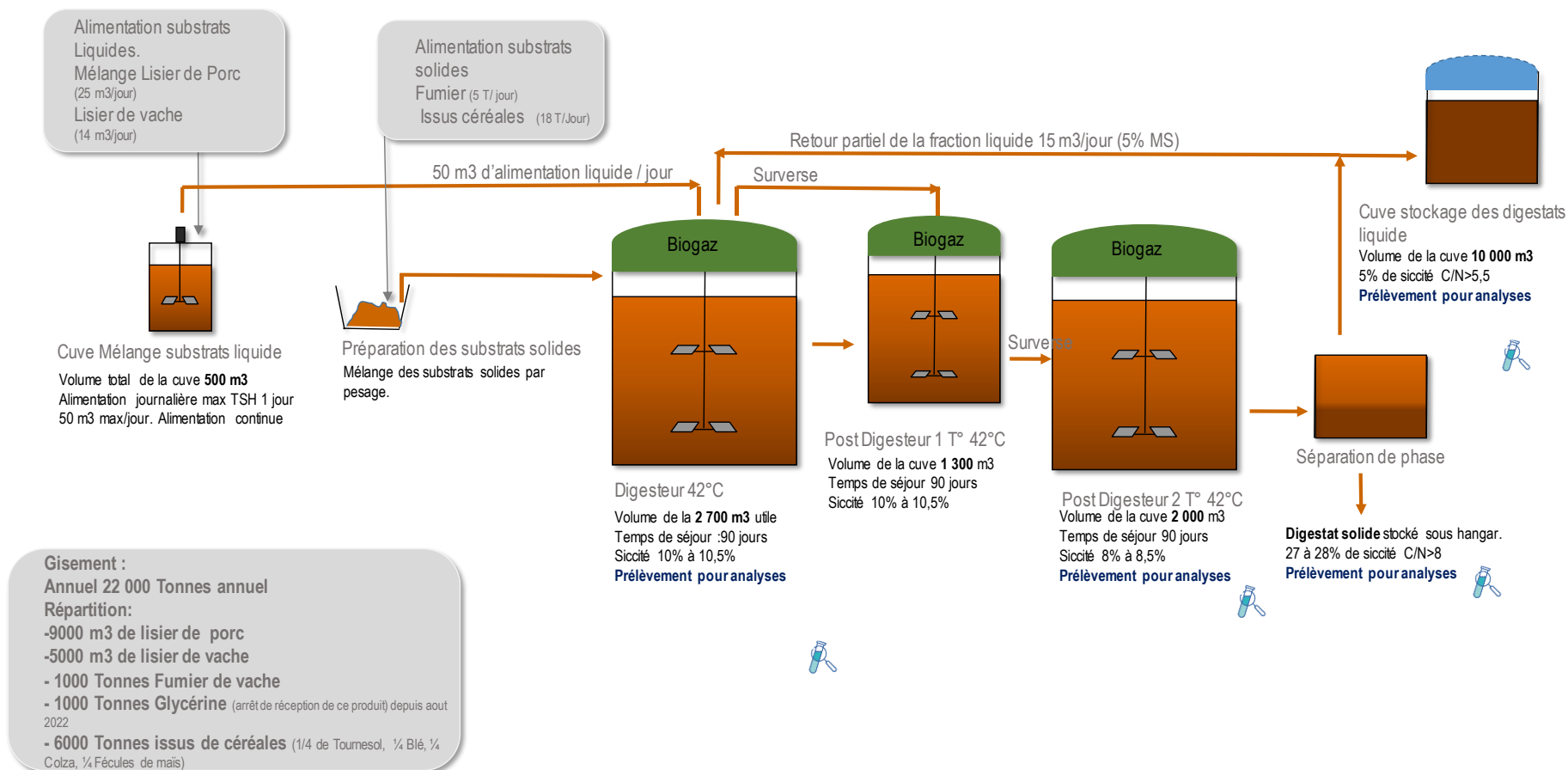
On note pour ces deux compartiments une baisse significative de la concentration en AGV avec une valeur de 0,8 g.L⁻¹ éq acétate dans le post digesteur comparativement à la valeur de 5,5 g.L⁻¹ éq acétate mesurée dans la fosse stockage/ mélange. Cet abattement de la concentration en AGV confirme que le processus biologique naturel était fonctionnel le jour des prélèvements et qu'aucune surcharge n'était constatée.

Cuve de stockage digestat : Les paramètres physicochimiques du digestat stocké sont représentatifs et logiquement similaires à ceux du post digesteur

Nous n'observons pas de carences liées en éléments azote, Phosphore et Potassium dans les quatre fosses.

Un échantillonnage du biogaz sur site n'a pas été réalisé, cependant les informations communiquées sur ce dernier point précisent un taux de CH₄ supérieur à 55%. L'activité méthanogène est bien présente dans le digesteur et post digesteur. La concentration en S_{total} dans le substrat d'alimentation reste significative mais ne devrait pas impacter sur le fonctionnement

4.1.3 Schéma de fonctionnement du site 2



4.1.4 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 2

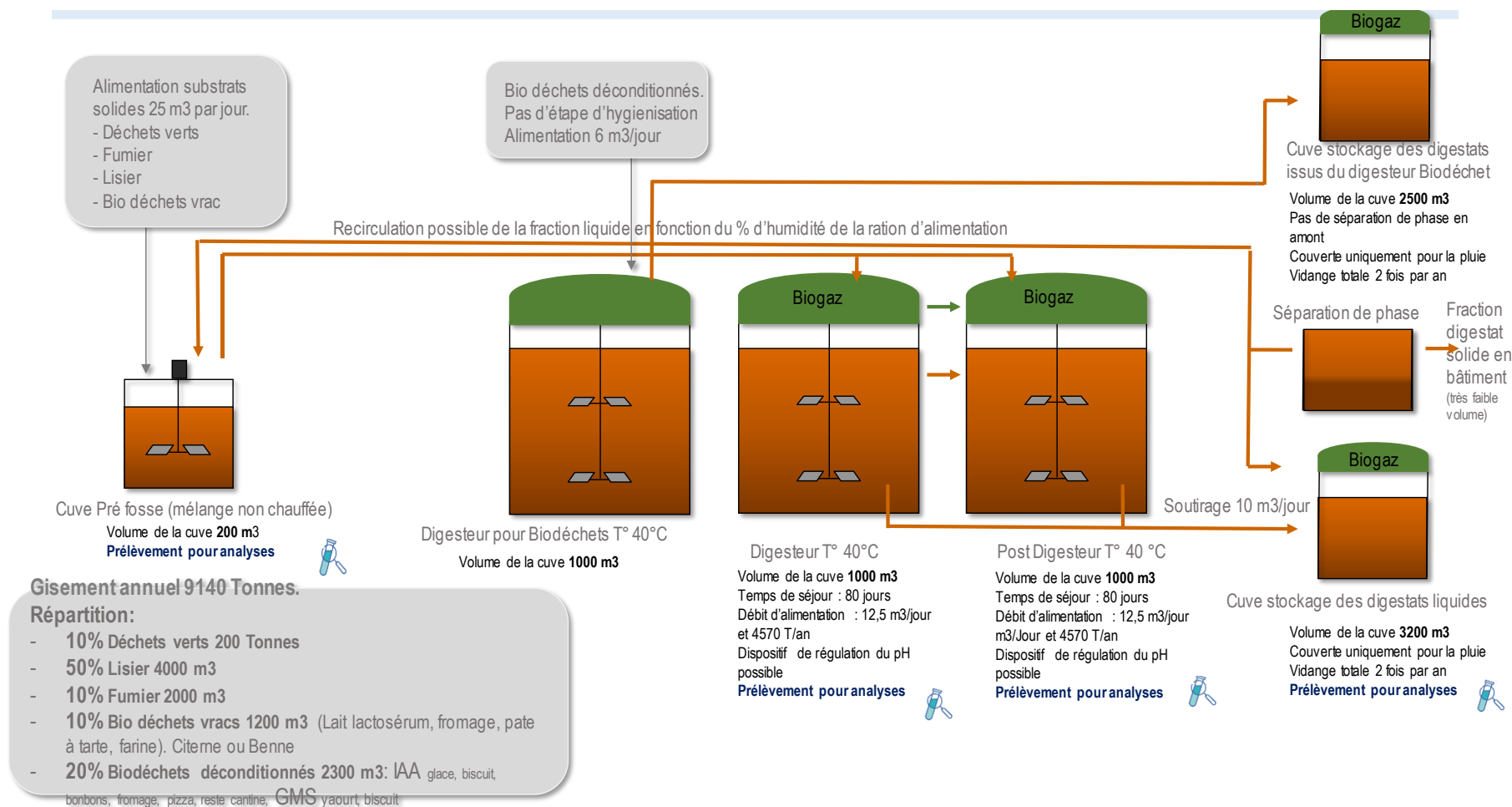
Tableau 5 : Caractérisation physicochimique de l'unité de traitement du site 2

-	Digesteur	Post Digesteur	Digestat Liquide	Digestat Solide	-	
Paramètre	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	unité ⁽¹⁾	technique / méthode
Humidité	89,5	91,9	95,9	68,7	%	CSOL-MO-0030
Matière sèche	10,5	8,1	4,1	31,3	%	CSOL-MO-0030
Matière Minérale	1,9	1,8	1,1	5,7	%	NF EN 13039 par calcination
Matière organique	8,6	6,3	3	25,6	%	NF EN 13039 par calcination
Titre Alcalimétrique Complet (TAC)	5,67	8,79	9,3	0	g(CaCO ₃)/L	Volumétrie
pH	7,6	8,2	8,3	8,1	unité pH	Extraction et mesure
Rapport MV/MS	81,90%	77,78%	73,17%	81,79%		
Azote Total	0,58	0,64	0,43	0,77		NF EN 13654-1 (Kjeldahl modifié)
Azote Ammoniacal	0,239	0,361	0,257	0,22	% N	Alcalinisation, Distillation puis Titration
Phosphore Total	0,24	0,23	0,12	0,88	% P ₂ O ₅	ICP selon NF EN ISO 11885
Potassium	0,42	0,4	0,3	0,31	% K ₂ O	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	0,08	0,09	0,05	0,28	% SO ₃	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	0,03	0,04	0,02	0,11	% S	ICP selon NF EN ISO 11885
Acides gras volatils (AGV) :						AGV CPG / INRAE
Acétate	1,507	0,468	0,291	0,150	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₂
Propionate	0,664	0,054	0,011	0,007	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₃
Iso-butyrate	0,132	0,005	0,001	0,000	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₄
Butyrate	0,021	0,004	0,000	0,000	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₄
Iso-valérate	0,171	0,004	0,000	0,000	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₅
Valérate	0,006	0,004	0,000	0,000	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₅
AGV totaux eq. Acétate	2,254	0,520	0,300	0,156	gC ₂ eq.L ⁻¹	AGV eq. C ₂ /calcul
AGV totaux eq. DCO	3,251	0,605	0,329	0,171	g.L ⁻¹	AGV eq. DCO /calcul
E. coli	910	<400	<400	9800	UFC/g	NF ISO 16649-2
Staphylocoques coagulase +	<10	<10	<10	<10	UFC/g	NF EN ISO 6888-2
Clostridium perfringens	61000 N'	42000 N'	49000 N'	15000 N'	UFC/g	NF EN ISO 7937
Listeria monocytogenes	<100	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 11290-2
Entérocoques	6000	14000	910	1800	UFC/g	Slanetz + BEA

NE : nombre estimé, prend en compte l'estimation des petits nombres

N' : nombre calculé à partir de la dernière dilution ensemencée

4.1.5 Schéma de fonctionnement du site 3



4.1.6 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 3

Tableau 6 : Caractérisation physicochimiques de l'unité de traitement du site 3

	Pré fosse Mélange	Digesteur	Post digesteur	Stock digestat		
Paramètre	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	unité ⁽¹⁾	technique / méthode
Humidité	84,1	92,1	92,3	94,1	%	CSOL-MO-0030
Matière sèche	15,9	7,9	7,7	5,9	%	CSOL-MO-0030
Matière Minérale	2,1	2,6	2,6	2,1	%	NF EN 13039 par calcination
Matière organique	13,8	5,3	5,1	3,8	%	NF EN 13039 par calcination
Titre Alcalimétrique Complet (TAC)	4,59	14,51	15,51	18,33	g(CaCO ₃)/L	Volumétrie
pH	4,7	8,2	8,5	8,4	unité pH	Extraction et mesure
Rapport MV/MS	86,79%	67,09%	66,23%	64,41%		
Azote Total	0,71	0,75	0,79	0,84	% N	NF EN 13654-1 (Kjeldahl modifié)
Azote Ammoniacal	0,322	0,489	0,563	0,641	% N	Alcalinisation, Distillation puis Titration
Phosphore Total	0,21	0,17	0,18	0,16	% P ₂ O ₅	ICP selon NF EN ISO 11885
Potassium	0,35	0,45	0,44	0,38	% K ₂ O	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total SO ₃	0,05	0,08	0,08	0,06	% SO ₃	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total S	0,02	0,03	0,03	0,03	% S	ICP selon NF EN ISO 11885
Acides gras volatils (AGV) :						AGV CPG / INRAE
Acétate	8,258	1,88	0,95	0,61	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₂
Propionate	1,008	0,98	0,41	0,49	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₃
Iso-butyrate	0,034	0,05	0,06	0,01	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₄
Butyrate	0,606	0,01	0,00	0,00	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₄
Iso-valérate	0,043	0,24	0,01	0,00	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₅
Valérate	0,033	0,00	0,00	0,00	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₅
AGV totaux eq. Acétate	9,556	2,86	1,33	1,01	gC ₂ eq.L ⁻¹	AGV eq. C ₂ /calcul
AGV totaux eq. DCO	11,653	4,08	1,77	1,41	g.L ⁻¹	AGV eq. DCO /calcul
<i>E. coli</i>	<100	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 16649-2
<i>Staphylocoques coagulase</i> +	<10	<10	<10	<10	UFC/g	NF EN ISO 6888-2
<i>Clostridium perfringens</i>	<1000	21000 N'	<1000	2800	UFC/g	NF EN ISO 7937
<i>Listeria monocytogenes</i>	<100	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 11290-2
Entérocoques	4400 N'	600 NE	<100	400 NE	UFC/g	Slanetz + BEA

NE : nombre estimé, prend en compte l'estimation des petits nombres

N' : nombre calculé à partir de la dernière dilution ensemencée

L'ensemble des analyses physicochimiques mesurées sur le site 3 et à différentes étapes du processus indiquent que la chaîne de traitement était fonctionnelle lors de la campagne d'échantillonnage et que le processus biologique ne présentait pas de dysfonctionnement particulier. Des points remarquables sont tout de même à noter pour chacune des étapes à savoir :

Pré fosse mélange : Le rapport MV/MS très élevé de 87% indique que le produit à dégrader présente une bonne concentration en matière organique potentiellement accessible par les microorganismes. La concentration en azote mesurée est de 7,1 g.L⁻¹ de N total ce qui peut potentiellement présenter un risque pour le dispositif biologique. A cette concentration en azote dans le milieu une vigilance particulière doit être maintenue par l'exploitant de l'unité, pour s'assurer d'un fonctionnement optimal du processus biologique. Cet apport en azote dans le milieu est notamment liée à la proportion non négligeable de bio déchets (20%) dans la recette d'alimentation

La concentration en AGV reste élevée dans cette première cuve 9,6 g.L⁻¹ avec une valeur de pH logiquement basse 4,7 au vu de la concentration en AGV.

Digesteur et Post digesteur :

Les mesures en azote total et ammoniacal sont respectivement voisines de 8 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹. Le rapport NH₄⁺ / NTK témoigne d'une forte minéralisation de l'azote total dans ces deux cuves de traitement. A ces concentrations le consortium biologique présent dans le méthaniseur doit impérativement être acclimaté pour éviter tout risque de dysfonctionnement biologique. Dans cette configuration l'exploitation du méthaniseur est beaucoup plus sensible aux variations possibles des charges d'alimentation.

On note pour ces deux compartiments une baisse significative de la concentration en AGV avec une valeur constatée de 3 g.L⁻¹ équivalent acétate dans le digesteur et de 1,3 g.L⁻¹ équivalent acétate dans le post digesteur comparativement à la valeur de 9,5 g.L⁻¹ équivalent acétate mesurée dans la pré fosse stockage/ mélange. Cet abattement de la concentration en AGV confirme que le processus biologique naturel était fonctionnel le jour des prélèvements et qu'aucune surcharge n'était constatée.

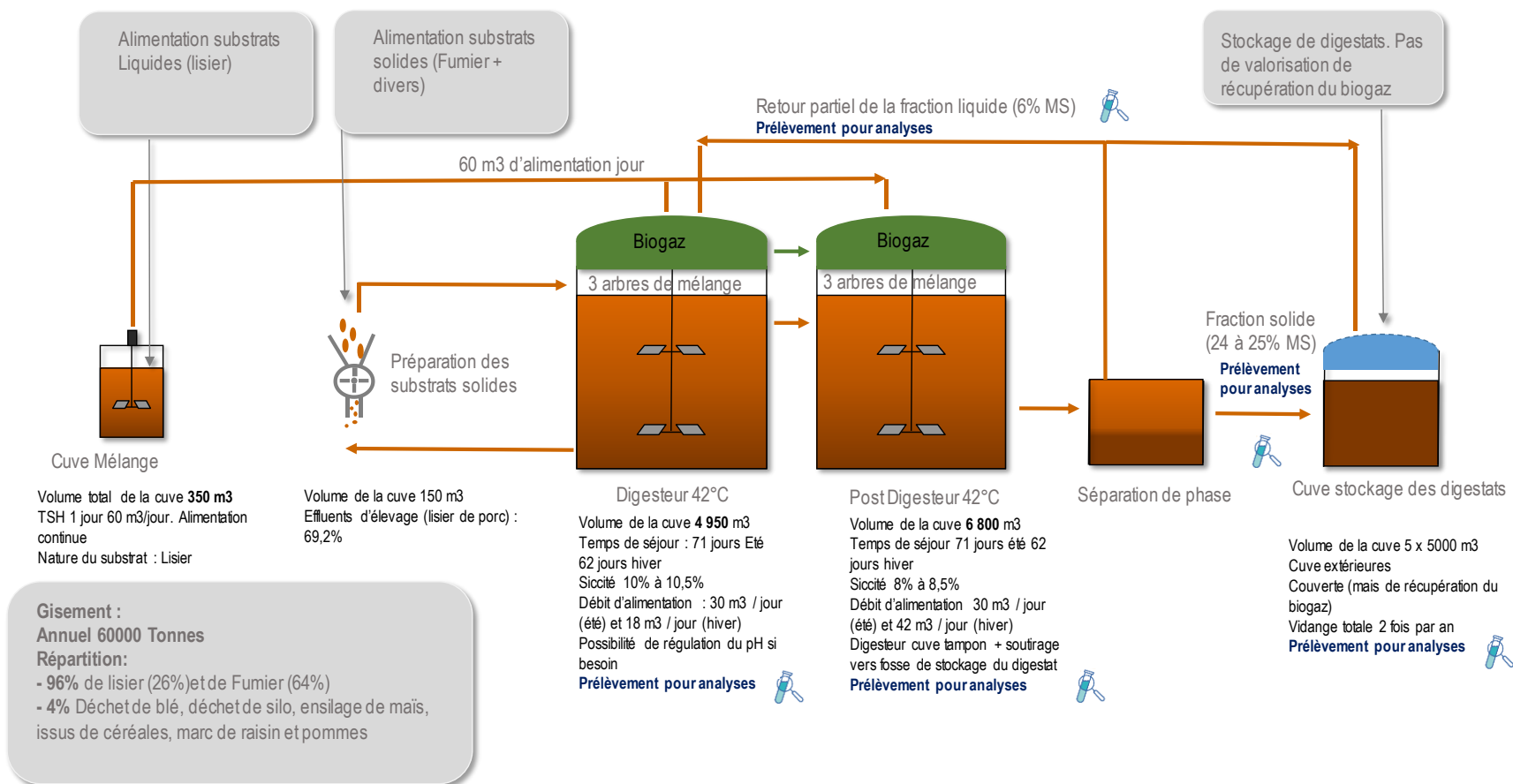
Le pH mesuré est dans une fourchette optimale pour le processus de méthanisation avec une valeur de stabilisation proche de 8 sans apport d'additif

Cuve de stockage digestat : Pour cette dernière cuve on note encore une concentration en AGV encore significative proche de 1 g.L⁻¹ équivalent acétate. A cette concentration le digestat demande probablement un temps de maturation nécessaire pour obtenir une stabilité. En dehors de ce constat les paramètres physicochimiques du digestat stocké sont représentatives et logiquement similaires à celles du post-digesteur.

Pour l'ensemble des différentes fosses, nous n'observons pas de carences liées en éléments azote, Phosphore et Potassium

Un échantillonnage du biogaz sur site n'a pas été réalisé, cependant les informations communiquées sur ce dernier point précisent un taux de CH₄ supérieur à 55%. L'activité méthanogène est bien présente dans le digesteur et post digesteur. La concentration en S_{total} dans le substrat d'alimentation reste significative mais ne devrait pas impacter sur le fonctionnement.

4.1.7 Schéma de fonctionnement du site 4



4.1.8 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 4

Tableau 7 : Caractérisation physicochimiques de l'unité de traitement du site 4

-	Digesteur	Post Digesteur	Digestat solide*	Digestat liquide	-	
Paramètre	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	unité ⁽¹⁾	technique / méthode
Humidité	90,3	91,8	70,6	93,6	%	CSOL-MO-0030
Matière sèche	9,7	8,2	29,4	6,4	%	CSOL-MO-0030
Matière Minérale	2,5	2,4	6	2,3	%	NF EN 13039 par calcination
Matière organique	7,2	5,8	23,4	4,1	%	NF EN 13039 par calcination
Titre Alcalimétrique Complet (TAC)	9,57	8,49	10	11,79	g(CaCO ₃)/L	Volumétrie
pH	7,9	8,1	8,2	8,2	unité pH	Extraction et mesure
Rapport MV/MS	74,23%	70,73%	79,59%	64,06%	%	
Azote Total	0,52	0,51	1,17	0,50	% N	NF EN 13654-1 (Kjeldahl modifié)
Azote Ammoniacal	0,254	0,29	0,024	0,31	% N	Alcalinisation, Distillation puis Titration
Phosphore Total	0,22	0,21	0,71	0,19	% P ₂ O ₅	ICP selon NF EN ISO 11885
Potassium	0,63	0,62	0,97	0,61	% K ₂ O	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	0,11	0,10	0,44	0,08	% SO ₃	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	0,04	0,04	0,18	0,03	% S	ICP selon NF EN ISO 11885
Acides gras volatils (AGV) :						AGV CPG / INRAE
Acétate	0,341	0,32	0,179	0,17	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₂
Propionate	0,036	0,09	0	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₃
Iso-butyrate	0	0	0	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₄
Butyrate	0	0	0	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₄
Iso-valérate	0	0	0	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₅
Valérate	0	0	0	0	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₅
AGV totaux eq. Acétate	0,371	0,39	0,179	0,17	gC ₂ eq.L ⁻¹	AGV eq. C ₂ /calcul
AGV totaux eq. DCO	0,419	0,47	0,191	0,18	g.L ⁻¹	AGV eq. DCO /calcul
<i>E. coli</i>	400 NE	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 16649-2
<i>Staphylocoques coagulase +</i>	<10	<10	<10	<10	UFC/g	NF EN ISO 6888-2
<i>Clostridium perfringens</i>	20000 N'	32000 N'	150	35000 N'	UFC/g	NF EN ISO 7937
<i>Listeria monocytogenes</i>	<100	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 11290-2
<i>Entérocoques</i>	2200	400 NE	400 NE	<400	UFC/g	Slanetz + BEA

* cet échantillon s'est avéré particulièrement atypique durant l'étude tant du point de vues des analyses physico-chimiques que microbiologiques, un problème lors du prélèvement ou un stockage très long peuvent en être la cause. Les valeurs mesurées pour ce point de prélèvement n'ont pas été prises en compte dans l'interprétation des données

NE : nombre estimé, prend en compte l'estimation des petits nombres

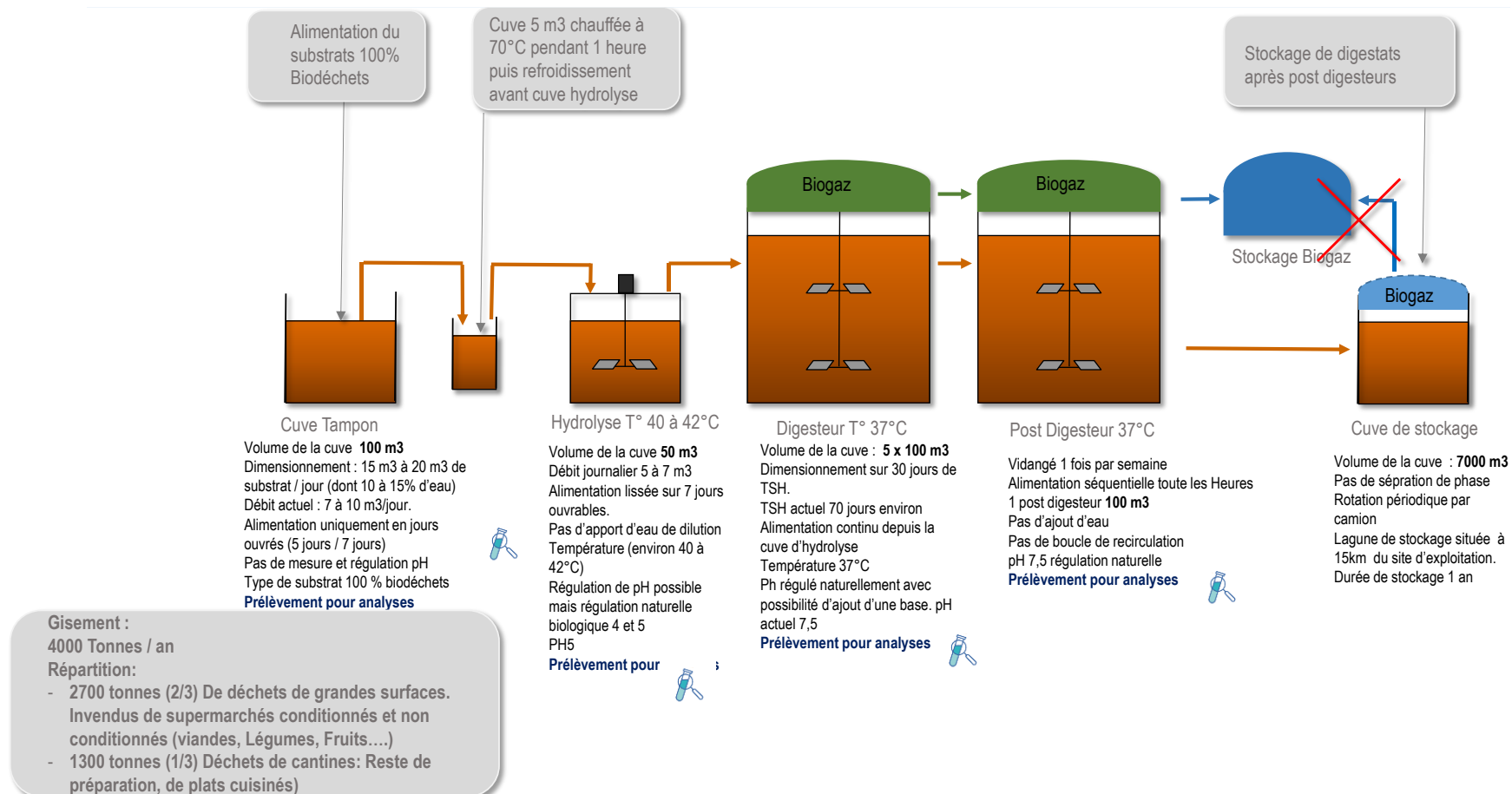
N' : nombre calculé à partir de la dernière dilution ensemencée

L'ensemble des analyses physicochimiques mesurées sur le site et à différentes étapes du processus indiquent que la chaîne de traitement était fonctionnelle lors de la campagne d'échantillonnage. Quelques points remarquables sont à noter dans les compartiments suivants :

Digesteur et Post digesteur : Dans ces deux compartiments le taux de matière sèche est inférieur à 10% ce qui est conforme au cahier des charges attendu par l'exploitant. Cette valeur est largement représentative des conditions d'exploitation habituellement mesurées avec ce type de recette pour des procédés en condition infiniment mélangée. Le rapport MV/MS voisin de 70% indique que le produit à dégrader présente une concentration cohérente en matière organique potentiellement dégradable. Les concentrations en azote total restent élevées mais conformes aux valeurs usuelles d'exploitation. Certaines configurations d'exploitation de réacteurs de méthanisation permettent de travailler à des valeurs en azote supérieures à celles mesurées sur le site 4. Pour chacun des compartiments les valeurs de pH sont stabilisées naturellement.

La concentration en AGV dans le milieu est stable et les concentrations mesurées sont faibles voire très faibles tout au long du processus. Les valeurs en acétate ne dépassent pas $0,341 \text{ g.L}^{-1}$ et celles des AGV en C3 $0,036 \text{ g.L}^{-1}$. Ces faibles concentrations sont de bons indicateurs pour confirmer que les réacteurs n'étaient pas en surcharge biologique au moment de la campagne de prélèvement.

4.1.9 Schéma de fonctionnement du site 5



4.1.10 Paramètres physico-chimiques des échantillons du site 5

Tableau 8 : Caractérisation physicochimique de l'unité de traitement du site 5

	Cuve tampon	Cuve Hydrolyse	Digesteur	Post-Digesteur		
Paramètre	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	valeur sur Brut	unité ⁽¹⁾	technique / méthode
Humidité	77,9	78,1	95,8	95,8	%	CSOL-MO-0030
Matière sèche	22,1	21,9	4,2	4,2	%	CSOL-MO-0030
Matière Minérale	1,7	1,7	1,5	1,5	%	NF EN 13039 par calcination
Matière organique	20,4	20,2	2,7	2,7	%	NF EN 13039 par calcination
Carbone Organique Total (COT)	12,2	12,3	1,6	1,6	%	CSOL-MO-0091
pH	3,8	3,7	8,1	7,9	unité pH	Extraction et mesure
Rapport MV/MS	92,31%	92,24%	64,29%	64,29%		0
Azote Total	0,89	0,85	0,87	0,9	% N	NF EN 13654-1 (Kjeldahl modifié)
Azote Ammoniacal	0,0711	0,0684	0,649	0,668	% N	Alcalinisation, Distillation puis Titration
Phosphore Total	0,24	0,24	0,18	0,18	% P2O5	ICP selon NF EN ISO 11885
Potassium	0,27	0,26	0,26	0,26	% K2O	ICP selon NF EN ISO 11885
Soufre total	0,04	0,04	0,07	0,07	% SO3	ICP selon NF EN ISO 11885
Acides gras volatils (AGV) :						AGV CPG / INRAE
Acétate	9,097	8,183	2,319	3,353	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₂
Propionate	0,342	1,187	0,721	0,688	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₃
Iso-butyrate	0,018	0,039	0,113	0,148	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₄
Butyrate	0,151	0,138	0,041	0,052	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₄
Iso-valérate	0	0,018	0,125	0,272	g.L ⁻¹	AGV CPG - IC ₅
Valérate	0	0,001	0	0,008	g.L ⁻¹	AGV CPG - C ₅
AGV totaux eq. Acétate	9,49	9,277	3,082	4,212	gC2eq.L ⁻¹	AGV eq. C ₂ /calcul
AGV totaux eq. DCO	10,528	10,886	4,1	5,552	g.L ⁻¹	AGV eq. DCO /calcul
<i>E. coli</i>	<10	<10	<10	<10	UFC/g	NF ISO 16649-2
(*) <i>Staphylocoques coagulase +</i>	<10	<10	<10	<10	UFC/g	NF EN ISO 6888-2
(*) <i>Clostridium perfringens</i>	50000	<10	700	2300	UFC/g	NF EN ISO 7937
<i>Listeria monocytogenes</i>	<100	<100	<100	<100	UFC/g	NF EN ISO 11290-2
Entérocoques	<100	<100	<100	<100	UFC/g	Slanetz+ BEA

NE : nombre estimé, prend en compte l'estimation des petits nombres

N' : nombre calculé à partir de la dernière dilution ensemencée

L'ensemble des analyses physicochimiques mesurées sur le site 5 et à différentes étapes du processus indique que la chaîne de traitement était fonctionnelle lors de la campagne d'échantillonnage et que le processus biologique ne présentait pas de dysfonctionnement particulier. Des points remarquables sont tout de même à noter pour chacune des étapes à savoir :

Cuve tampon : Le rapport MV/MS de 92,3% indique que le produit à dégrader présente une forte concentration en matière organique potentiellement accessible par les microorganismes. Compte tenu de la nature du substrat dégradé constitué à 100 % de biodéchets (forte concentration en protéine), la concentration en azote est élevée soit 8,9 g.l⁻¹ de N total ce qui peut potentiellement présenter un risque pour le dispositif biologique. A cette concentration en Azote dans le milieu, une vigilance particulière doit être maintenue par l'exploitant de l'unité, pour s'assurer d'un fonctionnement optimal du processus biologique. Dans cette première cuve la concentration en AGV est très élevée (voisine de 9,5 g.l⁻¹ éq acétate) concomitante avec une valeur de pH logiquement faible (3,8). Ces dernières données permettent de valider qu'une phase d'hydrolyse biologique naturelle débute dans cette première cuve.

Cuve Hydrolyse : Consécutivement à la cuve tampon, les paramètres de fonctionnement de la cuve hydrolyse restent logiques avec les valeurs mesurées dans la 1^{er} cuve Tampon. Dans cette 2^{eme} cuve, les valeurs mesurées sont logiques et similaires à celles de la cuve tampon à savoir une valeur de pH faible 3,7 et une concentration en AGV 9,3 g.l⁻¹ éq acétate. Le rapport MV/MS mesuré reste similaire à celui de la cuve tampon ce qui témoigne que la recette d'alimentation est stable entre ces deux premiers compartiments du procédé.

Digester et Post digester : En raison d'une recette d'alimentation constituée uniquement à 100 % de biodéchets, la forte teneur en Azote est logique. Les mesures en Azote total et ammoniacal sont respectivement de 8,7 g.L⁻¹ et 6,5 g.L⁻¹. A ces concentrations le consortium biologique présent dans le méthaniseur doit impérativement être acclimaté pour éviter tout risque de dysfonctionnement biologique. Dans cette configuration l'exploitation du méthaniseur est beaucoup plus sensible aux variations possibles des charges d'alimentation.

On observe au fil de ces deux compartiments une baisse significative de la concentration en AGV ainsi que de la concentration en matière organique dans le milieu, et une stabilisation naturelle du pH à des valeurs de pH proches de 8. Ces derniers indicateurs témoignent du bon fonctionnement biologique du processus au moment de la prise d'échantillon

En complément et pour l'ensemble des 4 fosses, nous n'observons pas de carences liées en éléments Azote, Phosphore et Potassium.

Un échantillonnage du biogaz sur site n'a pas été réalisé, cependant les informations communiquées sur ce dernier point précisent un taux de CH₄ supérieur à 55%. L'activité méthanogène est bien présente dans le digester et post digester. La concentration en S_{total} dans le substrat d'alimentation reste significative mais ne devrait pas impacter sur le fonctionnement

4.2 Résultats des analyses microbiologiques

4.2.1 Préparation et extraction des ADN

Les résultats des quantifications des matrices ADN par fluorimétrie (Qubit) et spectrophotométrie (Nanodrop) sont regroupés dans le **Tableau 9**. Dans l'ensemble, les ADN sont de très bonne qualité et respectent les pré-requis pour la préparation des librairies en vue du séquençage Shotgun.

Tableau 9: Contrôle qualité des ADN

Site	Référence échantillon	Nanodrop Concentration (ng/μl)	Ratio 260/280	Qubit Concentration (ng/μl)
Site 5 Cuve Tampon	2022-3194ter	253,9	1,84	177
Site 5 Hydrolyse	2022-3197ter	118,5	1,73	63,2
Site 5 Digesteur	2022-3195bis	2065,0	1,76	1564
Site 5 Post-Digesteur	2022-3196bis	2011,0	1,81	1492
Site 1 Fosse de stockage	2022-3785	1786,9	1,75	872
Site 1 Digesteur	2022-3786	822,6	1,75	776
Site 1 Post-Digesteur	2022-3787	739,4	1,71	656
Site 1 Digestat	2022-3788	965,1	1,58	760
Site 2 Digestat Solide	2022-4271	1867,4	1,85	1692
Site 2 Digestat Liquide	2022-4272	1278,2	1,83	1704
Site 2 Digesteur	2022-4270	2090,2	1,84	1026
Site 2 Post-Digesteur	2022-4273	1151,1	1,82	966
Site 3 Digesteur	2022-4286	1514,0	1,83	1100
Site 3 Post-Digesteur	2022-4287	979,7	1,83	1008
Site 3 Stockage digestat	2022-4288	628,6	1,89	748
Site 3 Préfosse	2022-4285	347,9	1,77	504
Site 4 Digesteur	2022-4289	615,5	1,82	764
Site 4 Digestat solide	2022-4290	593,0	1,69	696
Site 4 Digestat liquide	2022-4291	508,1	1,71	488
Site 4 Post-digesteur	2022-4292	707,3	1,7	580

4.2.2 Suivi quantitatif des pathogènes d'intérêt dans les 5 sites par les méthodes de cultures

Les mesures réglementaires effectuées par méthode culturale ont permis de suivre les concentrations en *Clostridium perfringens*, entérocoques et *E. coli* dans les différents compartiments des filières étudiées (Tableau 10). Les fréquences de détection sont de 85% pour *C. perfringens*, 60% pour les entérocoques et 30% pour *E. coli*. *Salmonella* spp., *S. aureus* et *L. monocytogenes* sont en dessous des limites de détection, allant de <10 UFC/g à <100 UFC/g selon les cibles et échantillons analysés.

Concernant *C. perfringens*, les concentrations les plus hautes sont mesurées dans les compartiments amont et dans le digesteur avec des valeurs supérieures à 60 000 UFC/g (avec une saturation de la culture) dans le cas du site 4. Les concentrations des compartiments aval, stockages et digestat restent parfois élevées avec des valeurs allant de 1 100 à 35 000 UFC/g. La mesure de la concentration en *C. perfringens* avec les méthodes actuelles de référence montre une limite importante du fait de la saturation des cultures, qui est retrouvée dans 40 % des échantillons avec les protocoles utilisés dans cette étude, ayant pour conséquence une limite de détection élevée.

Les plus fortes concentrations en entérocoques et *E. coli* cultivables sont retrouvées dans les compartiments amont (substrat en mélange) et digesteur. Quand elles sont mesurables en entrée, une diminution des concentrations au cours de la filière est observée et les entérocoques et les *E. coli* sont non-quantifiables dans 75% des échantillons de fin de filière (stockage ou digestat).

Le site 4 présente toutefois encore des concentrations mesurables dans le digestat solide avec des valeurs de 1 800 UFC/g et 9 800 UFC/g pour les entérocoques et *E. coli* respectivement, en lien avec les fortes concentrations mesurées en amont, atteignant 14 000 UFC/g au niveau du post-digesteur.

Tableau 10: Concentrations des cibles mesurées par les méthodes réglementaires.

	<i>Salmonella</i> (NPP/g)	Entérocoques (UFC/g)	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)	<i>C. perfringens</i> (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Staphylocoques coagulase + (UFC/g)
Site 2						
Digesteur	<10	2200	<100	20000 N'	400 NE	<10
Post Digesteur	<10	400 NE	<100	32000 N'	<100	<10
Digestat Solide	<10	400 NE	<100	150	<100	<10
Digestat Liquide	<10	<400	<100	35000 N'	<100	<10
site 3						
Préfosse	<10	4400 N'	<100	<1000	<100	<10
Digesteur	<10	600 NE	<100	21000 N'	<100	<10
Post Digesteur	<10	<100	<100	<1000	<100	<10
Stockage digestat	<10	400 NE	<100	2800	<100	<10
Site 4						
Digesteur	<10	6000	<100	61000 N'	910	<10
Post Digesteur	<10	14000	<100	42000 N'	<400	<10
Digestat Liquide	<10	910	<100	49000 N'	<400	<10
Digestat Solide	<10	1800	<100	15000 N'	9800	<10
Site 1						
Fosse de stockage	<10	1200	<100	250	25000	<100
Digesteur	<10	<100	<100	350	<100	<100
Post-Digesteur	<10	<100	<100	880	<100	<100
Cuve de Stockage	<10	<100	<100	1100	<100	<100
Digestat						

Site 5						
Cuve Tampon	<10	<100	<100	50000	<100	<100
Hydrolyse	<10	<100	<100	<10	<100	<100
Digesteur	<10	<100	<100	700	<100	<100
Post-Digesteur	<10	<100	<100	2300	<100	<100

NE : nombre estimé, prend en compte l'estimation des petits nombres

N' : nombre calculé à partir de la dernière dilution ensemencée

4.2.3 Suivi quantitatif et qualitatif des pathogènes d'intérêt dans les 5 sites par méthode moléculaire

Les échantillons prélevés dans les 5 sites ont été analysés en qPCR (Bactéries totales), ddPCR (*E.coli*, *Enterococcus* spp., *Salmonella enterica*, *C. perfringens*), et par séquençage Deep Shotgun (Mesure des abondances et diversité des espèces réglementaires présentes).

Tableau 11: Concentrations en copies de gènes codant pour l'ARNr 16S (Bactéries totales) par qPCR.

site	Copies de gènes codant pour l'ARNr 16S/g de MF
Site 1 - Fosse-de-stockage	$1,0 \times 10^{11}$
Site 1 - Digesteur	$7,3 \times 10^{10}$
Site 1 - Post-Digesteur	$7,2 \times 10^{10}$
Site 1 - Digestat	$2,3 \times 10^{10}$
Site 2 - Digesteur	$1,0 \times 10^{11}$
Site 2 - Post-digesteur	$2,2 \times 10^{11}$
Site 2 - Digestat-solide	$8,3 \times 10^{10}$
Site 2 - Digestat-liquide	$7,5 \times 10^{10}$
Site 3 - Prefosse	$5,0 \times 10^{10}$
Site 3 - Digesteur	$4,1 \times 10^{10}$
Site 3 - Post-digesteur	$5,8 \times 10^{10}$
Site 3 - Digestat	$4,6 \times 10^{10}$
Site 4 - Digesteur	$6,0 \times 10^{10}$
Site 4 - Post-digesteur	$3,3 \times 10^{10}$
Site 4 - Digestat-solide	$4,5 \times 10^{10}$
Site 4 - Digestat-liquide	$2,2 \times 10^{10}$
Site 5 - Cuve-Tampon	$9,7 \times 10^9$
Site 5 - Hydrolyse	$3,9 \times 10^9$
Site 5 - Digesteur	$7,2 \times 10^{10}$
Site 5 - Post-digesteur	$8,7 \times 10^{10}$

Site 2

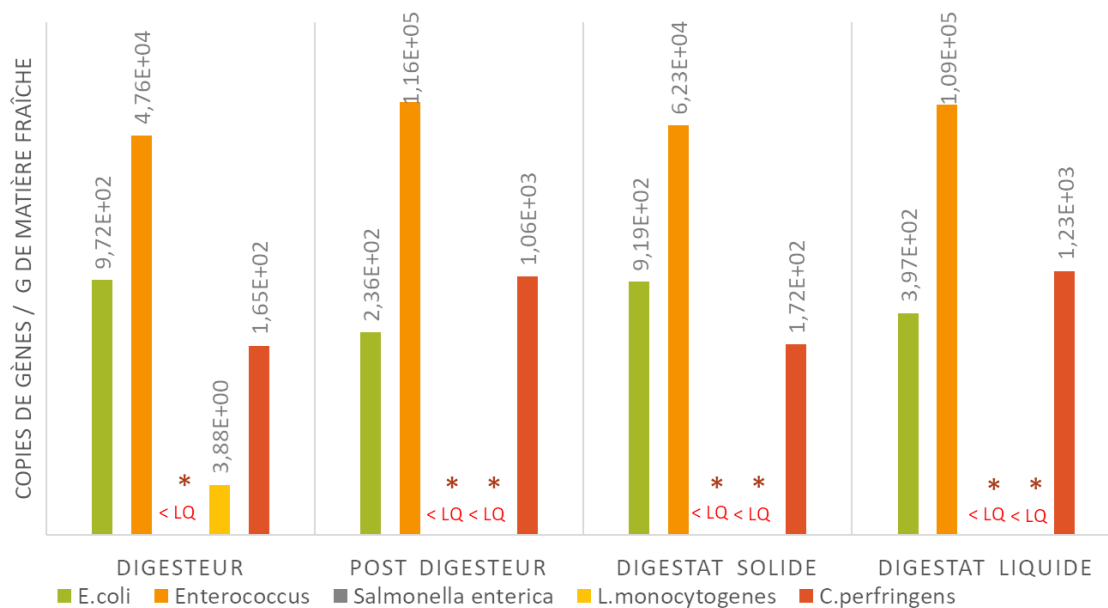


Figure 3 : Quantification des bactéries totales par qPCR et des cibles réglementaires par ddPCR du site 2

Les mesures de concentrations en bactéries sont proches dans les quatre compartiments de la filière du site 2, avec des valeurs classiquement retrouvées dans la littérature (Tonanzi et al., 2021), autour de 10^{11} copies de gènes codant pour l'ARNr 16S / g de MF. Quatre des cinq cibles d'intérêt ont été détectées dans le digesteur : *E.coli*, *Enterococcus* spp., *L. monocytogenes* et *C. perfringens*. Dans les compartiments en aval du digesteur, les concentrations restent stables (variations de moins d'1 $\log_{10}$) pour *E.coli*, *C. perfringens* et *Enterococcus* spp. Les cibles qui sont proches ou en dessous de la limite de quantification l'étaient également par culture.

L. monocytogenes, détectée et quantifiée dans le digesteur, est à une concentration inférieure à la limite de détection dans les autres compartiments. De plus, il semble y avoir une différence entre digestat liquide et digestat solide, moins concentré d'environ 1 $\log_{10}$ pour *C. perfringens* et 0,5 $\log_{10}$ pour *Enterococcus* spp.

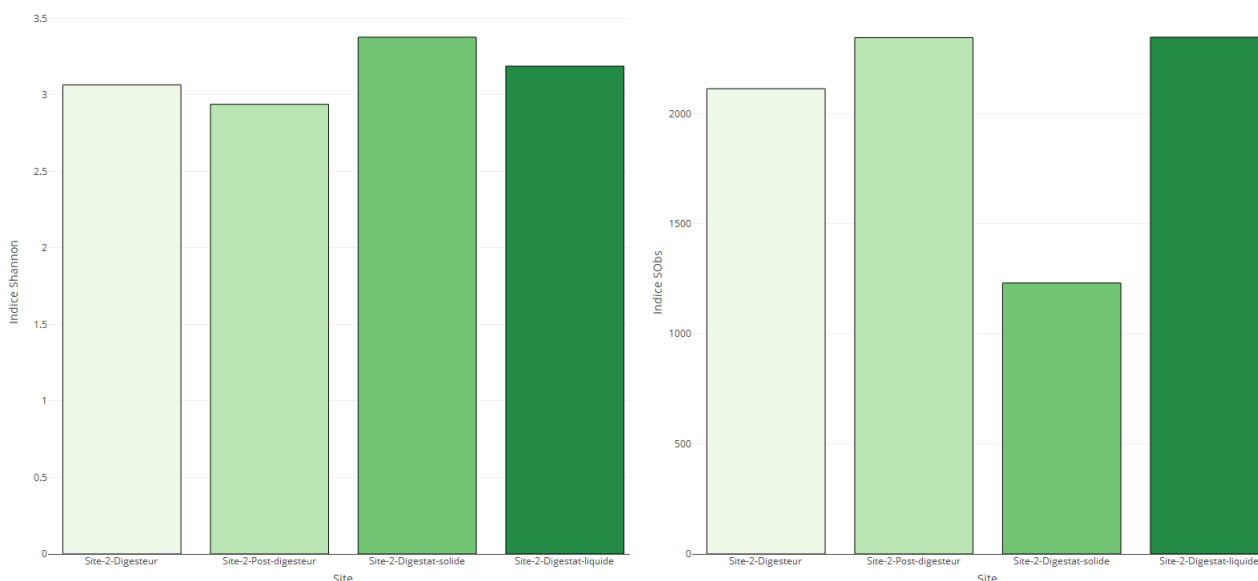


Figure 4 : Mesure des indices de Shannon (équité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 2

La richesse des différents compartiments est donnée par les indices de Shannon et le nombre d'OTU (Sobs). Le nombre d'OTU est supérieur à 2000 dans les compartiments digesteur, post-digesteur et digestat liquide, mais baisse de moitié (1,9 fois moins) dans le digestat solide. L'indice de Shannon tient compte de la richesse et de l'abondance des OTU dans l'échantillon. Dans le cas du site 2, les valeurs sont proches et montrent donc une équité comparable dans les différents compartiments, indiquant en particulier qu'un OTU n'a pas une abondance beaucoup plus élevée que les autres.

Site 3

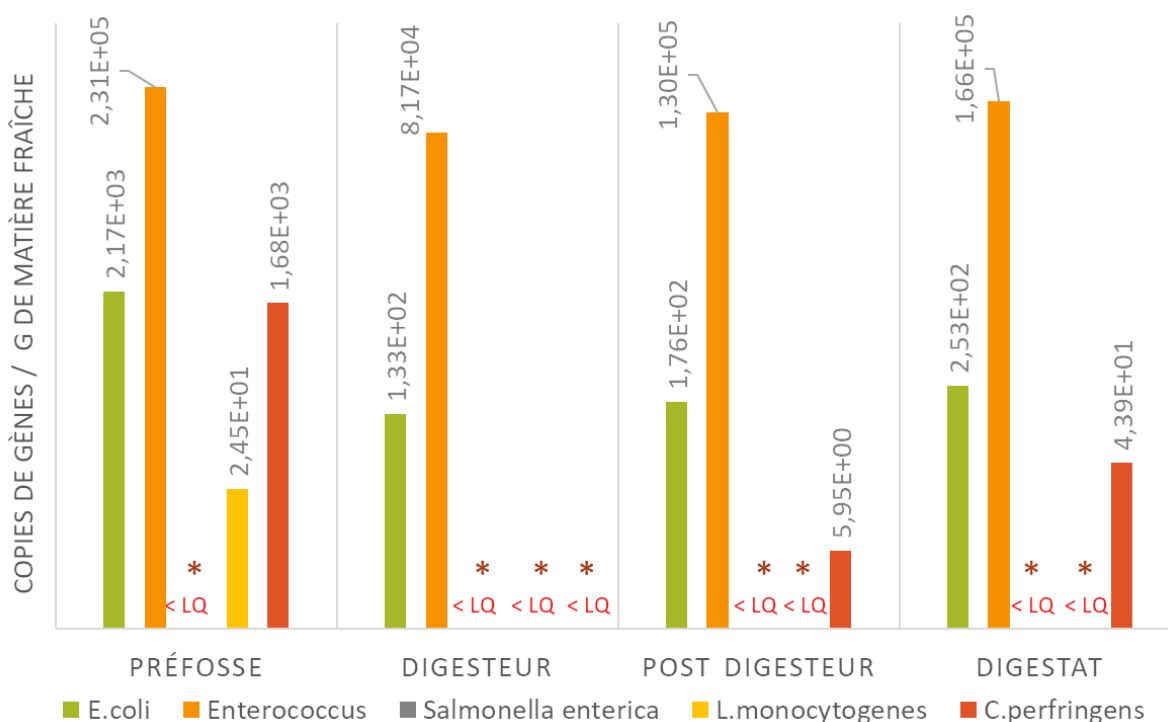


Figure 5 : Quantification des Bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 3

Pour le site 3, les mesures de concentrations en bactéries sont proches dans les quatre compartiments de la filière avec une valeur moyenne de $4,9 \cdot 10^{10}$ copies de 16S / g de MF, conforme aux valeurs retrouvées dans la littérature (Tonanzi et al., 2021). Quatre des 5 cibles sont quantifiées dans le compartiment pré-fosse avec des concentrations plus hautes de 1 log₁₀ et 0,4 log₁₀ par rapport aux compartiments aval, en particulier pour *E.coli* et *Enterococcus* qui restent ensuite dans les concentrations proches dans les compartiments post-digesteur et digestat. *L.monocytogenes*, détectée et quantifiée dans le digesteur est inférieure à la limite de détection dans les autres compartiments.

Les résultats montrent également des concentrations proches dans les quatre compartiments analysés pour *Enterococcus* avec une moyenne de $1,5 \cdot 10^5$ copies de gènes / g de MF. Concernant *C.perfringens* la concentration mesurée est plus haute dans la pré-fosse mais la cible n'est pas détectée dans le digesteur. La concentration obtenue par culture dans le digesteur (21 000N') est probablement une surestimation liée à un biais méthodologique (croissance d'une microflore non spécifique sur les boîtes de comptage). Les concentrations mesurées dans les compartiments post-digesteur et digestat sont égales à 44 et 6 copies de gènes/g de MF respectivement.

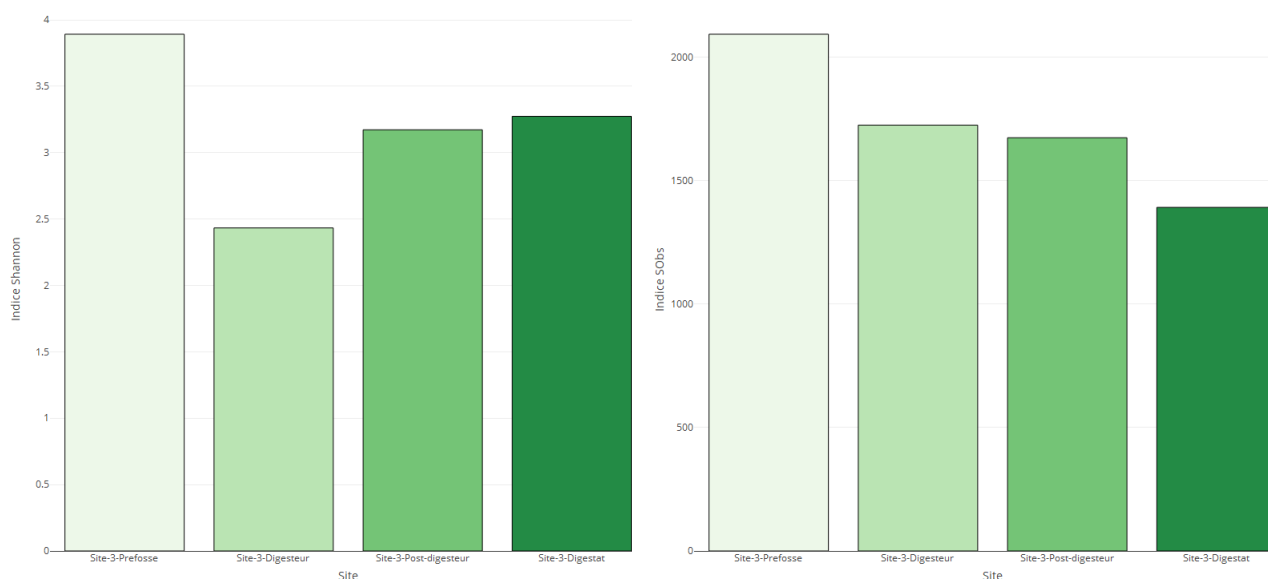


Figure 6 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 3

Les résultats de séquençage montrent que la richesse est de plus en plus faible au fur et à mesure de l'avancée dans la filière. En effet, le compartiment pré-fosse se caractérise par la présence de 2092 OTU et on dénombre seulement 1391 OTU dans le digestat. On ne peut pas identifier dans cette filière de paramètre environnementaux qui pourraient expliquer cette évolution, car l'étude n'a pas été conduite sous forme d'une cinétique (échantillons indépendants.). On note également au niveau des indices de Shannon, une baisse de 1,4 point entre les compartiments pré-fosse et digestat, indiquant probablement l'apparition d'une ou plusieurs OTU dominantes dans ce compartiment. Une exploration de la structure la diversité pourrait permettre leur identification et une meilleure compréhension de cette dynamique.

Site 4

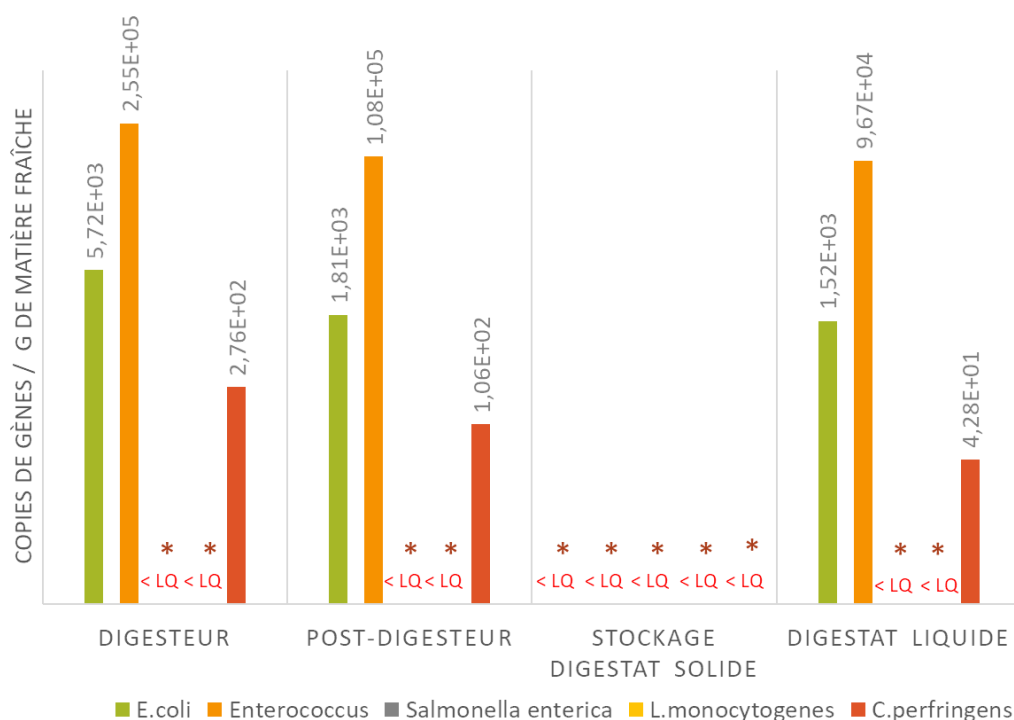


Figure 7 : Quantification des bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 4

Les mesures de concentrations en bactéries sont proches dans les quatre compartiments de la filière du site 4, avec des valeurs classiquement retrouvées dans la littérature (Tonanzi et al., 2021)), autour de 10^{10} copies de gènes 16S / g de MF. Quatre des cinq cibles d'intérêt ont été détectées dans le digesteur (*E. coli*, *Enterococcus spp.*, *L. monocytogenes* et *C. perfringens*). Les résultats montrent des concentrations similaires dans les quatre compartiments analysés pour *E. coli*, *C. perfringens* et *Enterococcus*. Il semble y avoir une différence entre digestat liquide et digestat solide importante. Nous suspectons un souci de prélèvement sur l'échantillon digestat solide, car la diversité de cet échantillon est très différente des autres comme le montre les indices de Shannon et le nombre d'OTU ci-dessous. Les analyses culturales avaient également révélé une concentration en *E. coli* étonnamment élevée (10 fois plus concentrée que dans le digesteur).

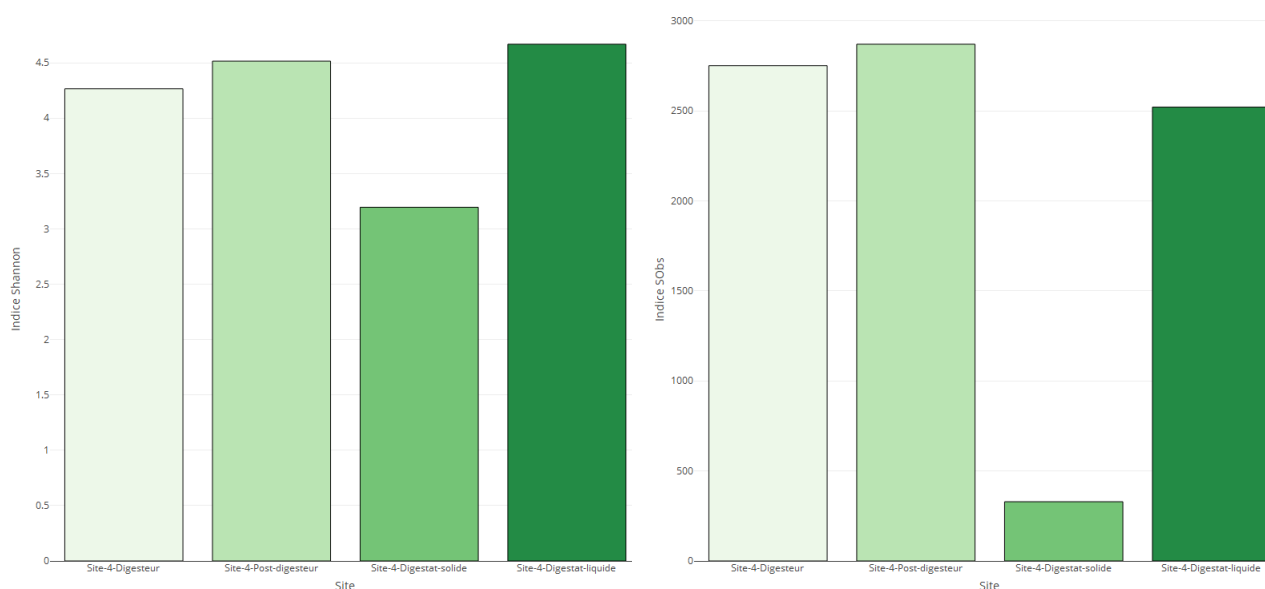


Figure 8 : Mesure des indices de Shannon (équité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 4

Pour ce site, les valeurs de la richesse sont plus hautes comme le montre les mesures des indices de diversité : supérieures à 2500 OTU et indices de Shannon supérieurs à 4,2.

Site 1 : Digesteur et Post-digesteur en thermophilie

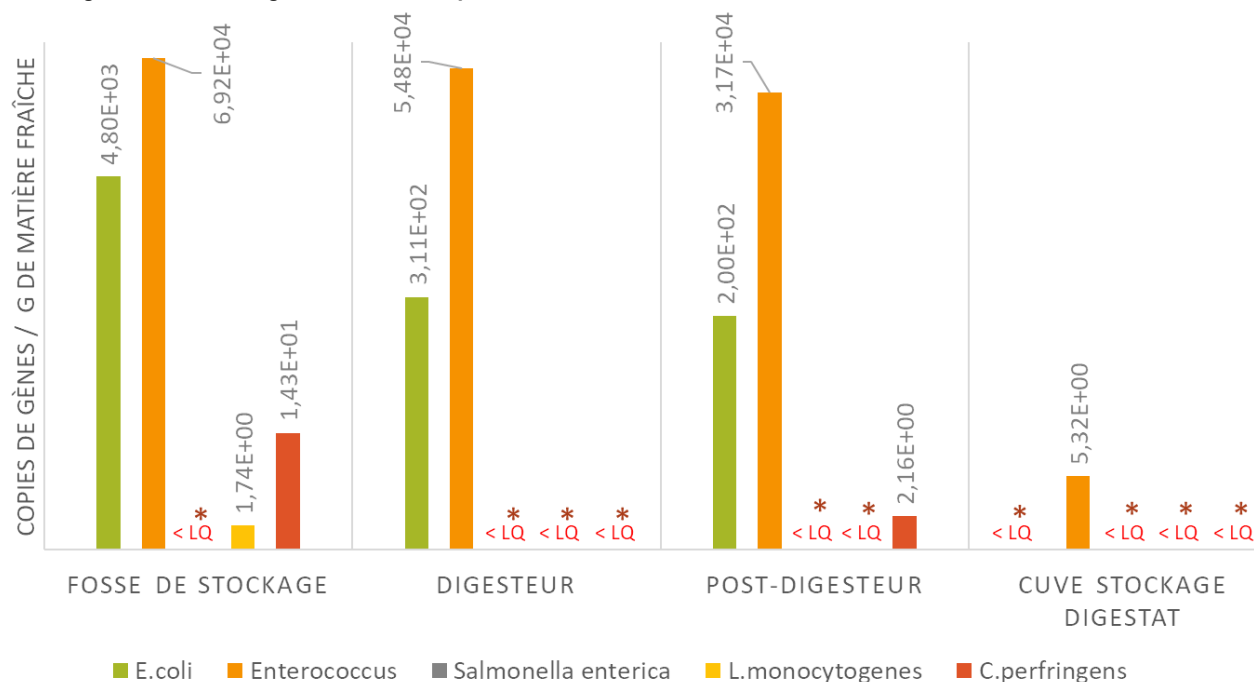


Figure 9 : Quantification des bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 1

Pour le site 1 qui fonctionne en thermophilie les mesures de concentrations en bactéries sont proches dans les quatre compartiments de la filière avec une valeur moyenne de $6,9 \cdot 10^{10}$ copies de 16S / g de MF. Quatre des cinq cibles d'intérêt ont été quantifiées dans la fosse de stockage. Une réduction de 1 $\log_{10}$ est mesurée dans le compartiment digesteur pour *E.coli*, comparativement à la fosse de stockage des intrants, la concentration étant similaire entre le digesteur et le post-digesteur. *E. coli* est non quantifiable dans la cuve de stockage. La filière permet un abattement de *E.coli*. Comme pour les sites 2, 3 et 5, *L. monocytogenes* est détectée et quantifiée dans les compartiments amont du digesteur, et sa concentration est inférieure à la limite de détection dans les autres compartiments. *Enterococcus* spp. est faiblement concentré dans la cuve de stockage des digestats, avec une concentration inférieure de plusieurs Log à celle de la cuve de stockage des intrants. Par contre, cette cible est peu sensible au traitement thermophile (concentration similaire entre cuve des intrants, le digesteur et le post-digesteur).

C. perfringens est plus faiblement concentré dans les intrants que sur les autres sites. La concentration mesurée est plus haute dans la fosse de stockage mais la cible n'est pas détectée dans le digesteur. On mesure une valeur de 5,3 copies de gènes/g MF dans le post-digesteur, ce qui suggère qu'il se maintient à des concentrations faibles dans cette filière. Les valeurs de concentrations mesurées dans la cuve de stockage semblent montrer qu'une concentration très faible des cibles réglementaires étudiées dans cette étude persiste durant le stockage. En effet, on note une valeur très faible d'*Enterococcus* dans ce compartiment et l'absence de détection des autres cibles. Les résultats de ce site ne montrent pas d'abattement lié à la thermophilie pour les enterocoques et sur *C. perfringens*.

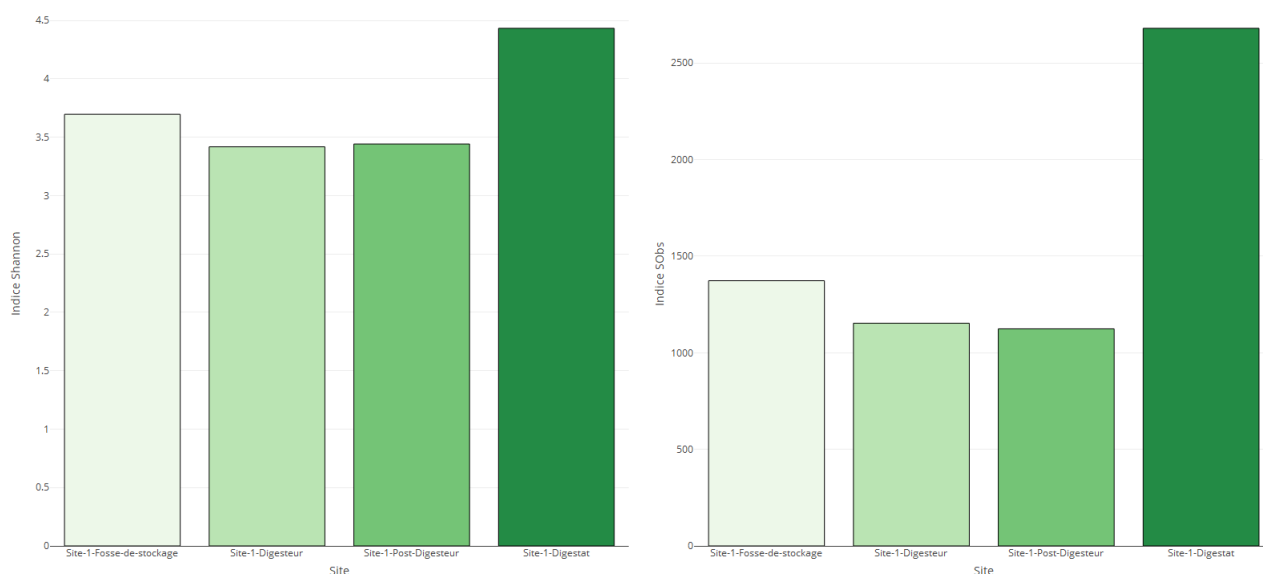


Figure 10 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 1

Les résultats de séquençage du site 1, au niveau du digestat stocké, indiquent des valeurs de la richesse plus hautes que dans les autres compartiments comme le montrent les mesures des indices de diversité supérieures à 2 500 OTU (x 2,3) et indices de Shannon supérieurs à 4,4 (+1 point). Ces résultats sont à mettre en parallèle des valeurs mesurées par ddPCR sur les cibles réglementaires et semblent indiquer une modification importante de la structure de la diversité bactérienne lors du stockage du digestat.

Site 5

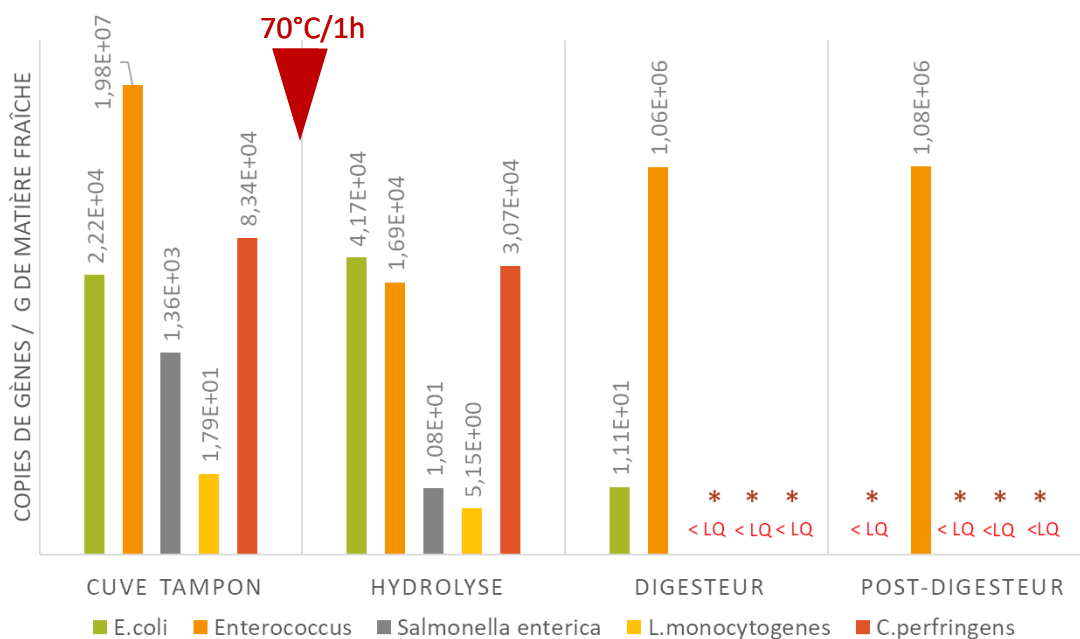


Figure 11 : Quantification des bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 5

Les mesures de concentrations en bactéries sont proches dans les deux premiers compartiments cuve tampon et hydrolyse avec une valeur moyenne $6,8 \cdot 10^9$ copies de 16S / g de MF. Les concentrations des deux compartiments suivants, digesteur et post-digesteur sont également proches entre elles avec valeur moyenne $8 \cdot 10^{10}$ copies de 16S / g de MF. Les résultats de ddPCR montrent des concentrations élevées pour les 5 cibles par rapport aux autres sites, et une quantification de *Salmonella enterica* qui était sous les limites de quantification pour les autres sites. Les résultats montrent également des concentrations plus faibles de 1 à 3 $\log_{10}$ dans le compartiment d'hydrolyse, suite à la pasteurisation pour les 4 cibles, hormis pour *E. coli* dont la concentration est plus basse d'environ 3 $\log_{10}$ uniquement dans le digesteur.

Concernant *Enterococcus* spp., la valeur mesurée est plus haute de 2 $\log_{10}$ dans le digesteur et se maintient dans le post-digesteur. Pour ce site, le substrat est un mélange de biodéchets et est donc très différents en termes de diversité bactérienne par rapport aux sites précédemment analysés dans cette étude.

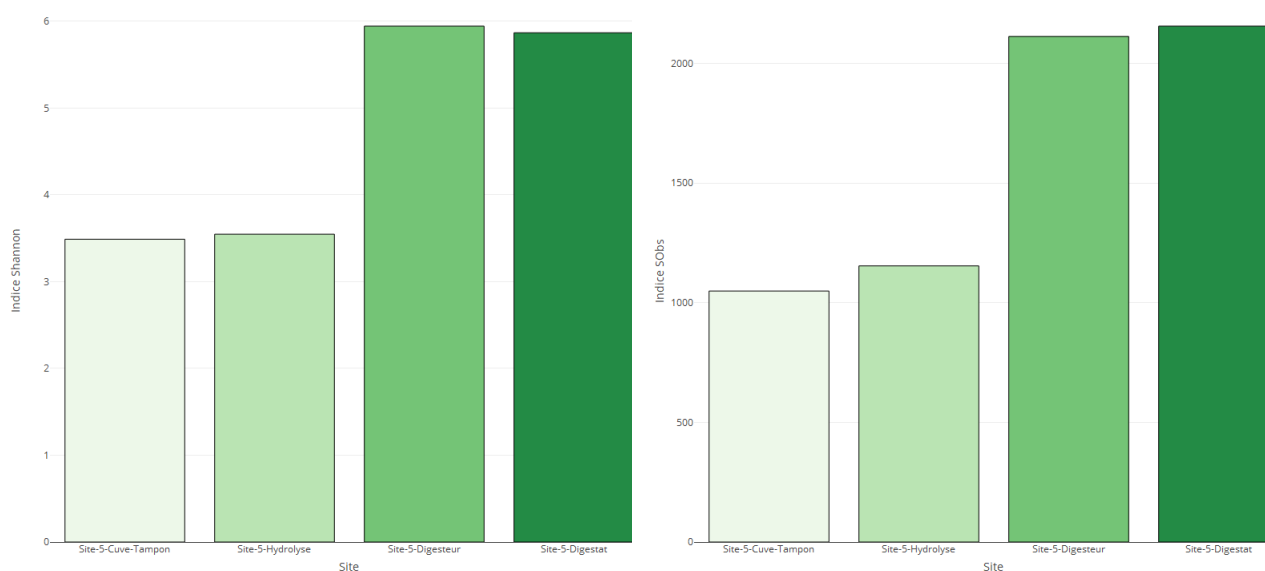


Figure 12 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 5

Comme observé pour les résultats de quantification par qPCR et ddPCR, on observe une similitude entre les échantillons amont (cuve tampon et cuve d'hydrolyse) et aval (digesteur et post-digesteur). En particulier, les résultats montrent un doublement de la richesse et des valeurs d'indice de Shannon 1,67 fois plus haute en moyenne. Ces observations sont à mettre en relation avec les caractérisations physico-chimiques de ces échantillons, qui montrent des différences de pH importantes (3,8 pour l'hydrolyse et 8,1 pour le digesteur).

4.2.4 Comparaison des sites sur la base de la diversité bactérienne

Afin d'explorer plus avant les différences de communautés bactériennes, des calculs de distance de Bray-Curtis ont été réalisés.

La distance de Bray-Curtis, ou indice de dissimilarité de Bray-Curtis, est utilisée en écologie microbienne pour évaluer la dissimilarité entre deux échantillons donnés, en termes d'abondance de taxons (phyla, espèces, OTUs...) présents dans chacun de ces échantillons. L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis est compris entre 0 (les deux échantillons ont la même composition) et 1 (les échantillons sont totalement dissemblables). Le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** montre que les communautés des matrices

du sites 3, site fonctionnant en thermophilie, sont très dissimilaires, et que les autres matrices sont très proches quel que soit le compartiment. Il apparaît donc que la température de process drive la diversité plus que le compartiment ou les proportions de la ration d'alimentation.

Concernant le site traitant les biodéchets (site 5), le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** montre également que les communautés des matrices du site 5 sont partagées en 2 groupes bien distincts : d'un côté la cuve tampon et le compartiment d'hydrolyse, de l'autre côté le digesteur et le digestat. Ces différences, et en particulier la spécificité de la cuve tampon et du compartiment d'hydrolyse du site 5 comparativement à tous les autres échantillons du projet apparaît également lors de l'analyse Shotgun du paragraphe suivant.

Tableau 12 : Comparaison des distances Bray-curtis exprimée en %

	Site 1 - Fosse-de-stockage	Site 1 - Digesteur	Site 1 - Post-Digesteur	Site 1 - Digestat	Site 2 - Digesteur	Site 2 - Post-digesteur	Site 2 - Digestat-solide	Site 2 - Digestat-liquide	Site 3 - Prefosse	Site 3 - Digesteur	Site 3 - Post-digesteur	Site 3 - Digestat	Site 4 - Digesteur	Site 4 - Post-digesteur	Site 4 - Digestat-solide	Site 4 - Digestat-liquide
Site 1 - Fosse-de-stockage	0%	14%	16%	56%	66%	78%	58%	62%	89%	86%	85%	87%	42%	90%	48%	30%
Site 1 - Digesteur	14%	0%	7%	51%	69%	81%	61%	64%	91%	88%	87%	88%	41%	92%	45%	36%
Site 1 - Post-Digesteur	16%	7%	0%	46%	70%	80%	62%	65%	91%	88%	86%	88%	41%	91%	44%	37%
Site 1 - Digestat	56%	51%	46%	0%	74%	78%	74%	77%	91%	88%	85%	86%	40%	87%	35%	47%
Site 2 - Digesteur	66%	69%	70%	74%	0%	80%	13%	18%	86%	77%	80%	89%	60%	94%	59%	56%
Site 2 - Post-digesteur	78%	81%	80%	78%	80%	0%	82%	83%	92%	90%	89%	88%	75%	88%	80%	76%
Site 2 - Digestat-solide	58%	61%	62%	74%	13%	82%	0%	11%	84%	76%	78%	87%	58%	93%	60%	48%
Site 2 - Digestat-liquide	62%	64%	65%	77%	18%	83%	11%	0%	86%	77%	80%	89%	62%	93%	64%	52%
Site 3 - Prefosse	89%	91%	91%	91%	86%	92%	84%	86%	0%	42%	36%	42%	89%	97%	91%	89%
Site 3 - Digesteur	86%	88%	88%	88%	77%	90%	76%	77%	42%	0%	14%	36%	86%	96%	90%	86%
Site 3 - Post-digesteur	85%	87%	86%	85%	80%	89%	78%	80%	36%	14%	0%	24%	84%	94%	88%	84%
Site 3 - Digestat	87%	88%	88%	86%	89%	88%	87%	89%	42%	36%	24%	0%	84%	93%	87%	85%
Site 4 - Digesteur	42%	41%	41%	40%	60%	75%	58%	62%	89%	86%	84%	84%	0%	90%	20%	20%
Site 4 - Post-digesteur	90%	92%	91%	87%	94%	88%	93%	93%	97%	96%	94%	93%	90%	0%	86%	88%
Site 4 - Digestat-solide	48%	45%	44%	35%	59%	80%	60%	64%	91%	90%	88%	87%	20%	86%	0%	26%
Site 4 - Digestat-liquide	30%	36%	37%	47%	56%	76%	48%	52%	89%	86%	84%	85%	20%	88%	26%	0%

	Site-5-Cuve-Tampon	Site-5-Hydrolyse	Site-5-Digesteur	Site-5-Post-Digestateur
Site-5-Cuve-Tampon	0%	2%	99%	99%
Site-5-Hydrolyse	2%	0%	99%	99%
Site-5-Digesteur	99%	99%	0%	20%
Site-5-Post-digesteur	99%	99%	20%	0%

La diversité des cibles réglementaires étudiées dans ce projet a été analysée par séquençage Deep Shotgun, qui permet d'identifier sans a priori les microorganismes présents dans un écosystème complexe à partir de l'ADN total de l'échantillon de caractériser la diversité des groupes microbiens présents, avec une précision au niveau taxonomique de l'espèce. Les données de séquences produites, plus de 30 millions par échantillon, permettent de mesurer l'abondance relative des espèces ciblées, y compris celles non quantifiables par ddPCR. Cependant, il convient de rappeler que ce n'est pas une technique quantitative.

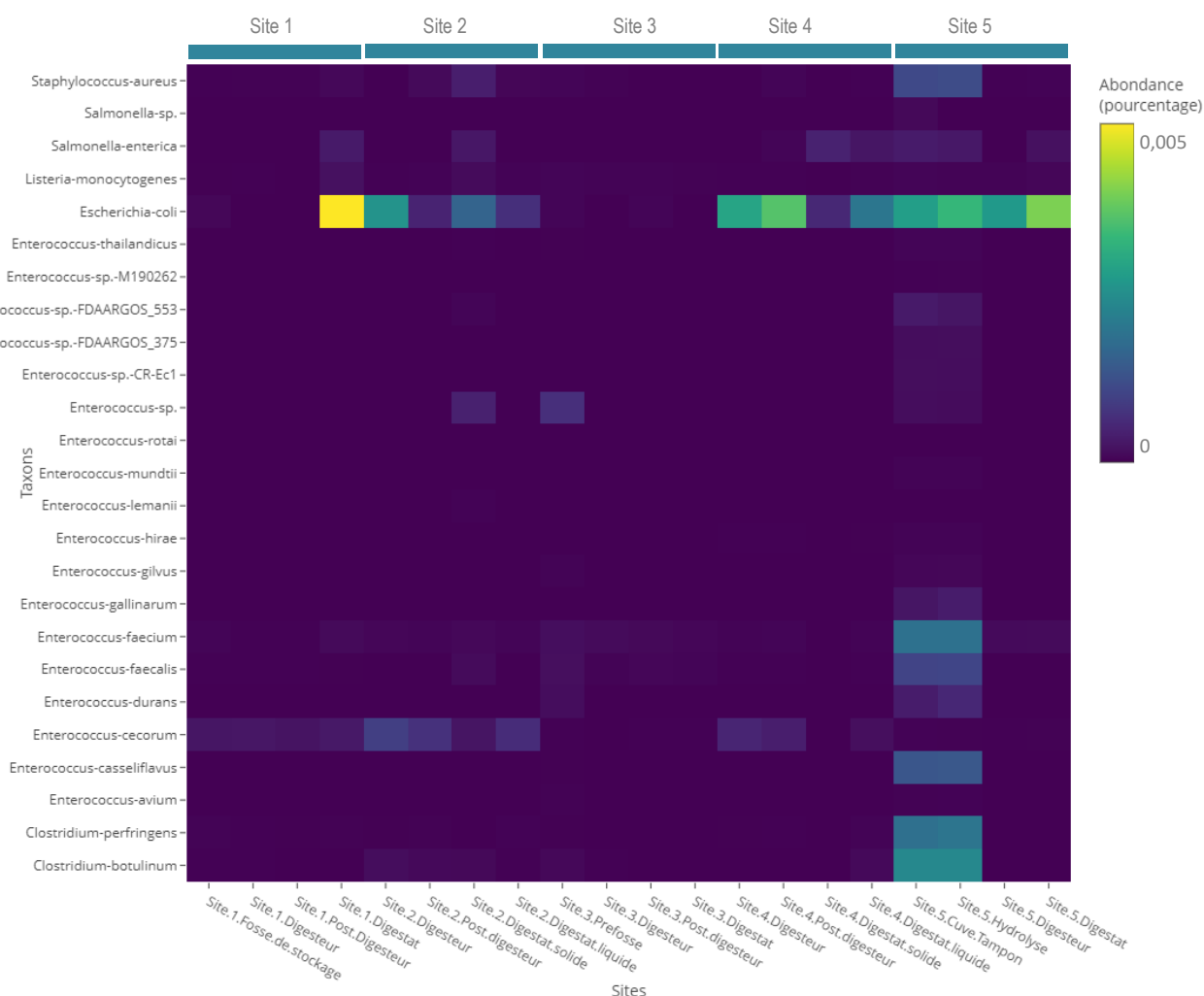


Figure 13 : Comparaison des abondances relatives (% de séquences) des cibles d'intérêt dans l'ensemble des échantillons.

La diversité bactérienne a été caractérisée par séquençage Deep Shotgun et les 5 cibles réglementaires ont été recherchées par analyses bioinformatiques. Trois cibles supplémentaires ont été également recherchées : *Mycobacterium avium subsp.paratuberculosis*, *Clostridium botulinum* et *Staphylococcus aureus* car elles sont fréquemment identifiées dans la bibliographie comme pouvant présenter un impact sanitaire sur la filière de méthanisation. Toutes les cibles ont des valeurs d'abondance très faibles, inférieure à 0,005% (valeur seuil de référence. (Bokulich et al., 2013)).

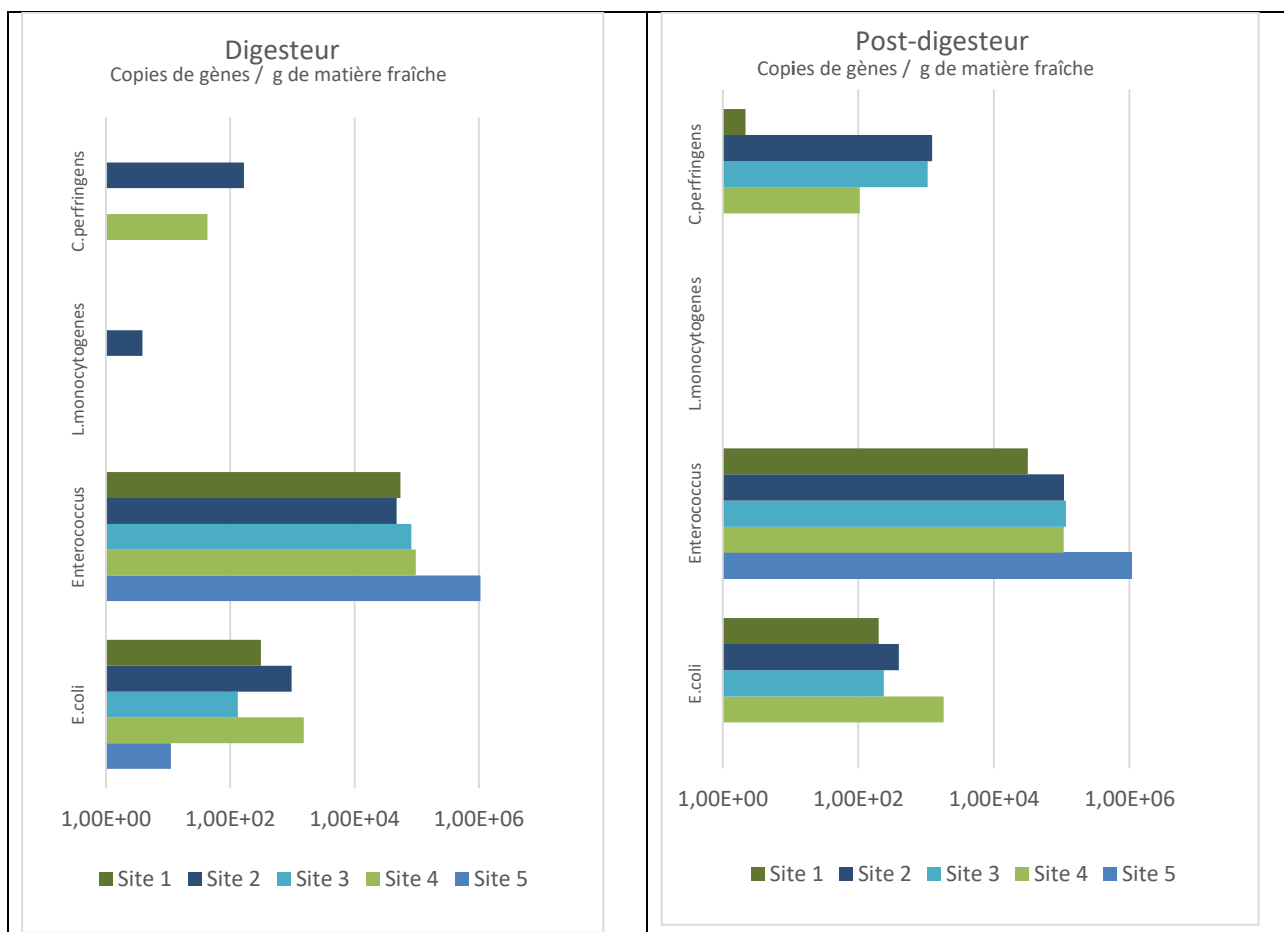
La Figure 13 montre que la cuve tampon et le compartiment d'hydrolyse du site 5 traitant les biodéchets contiennent une grande diversité de cibles d'intérêt sanitaire dont une diversité élevée d'*Enterococcus spp.*, les deux espèces de *Clostridium* (*C. perfringens* et *C. botulinum*) et *Staphylococcus aureus*, toutes cependant dans des abondances inférieures à 0,005% du nombre total de séquences. Les résultats montrent une diversité importante du genre *Enterococcus spp.* (17 espèces sur les 75 présentes dans la

taxonomie Genbank) en particulier dans la cuve tampon et l'hydrolyse du site traitant des biodéchets, alors que seuls *E. cecorum* et *E. faecium* sont présents dans le digesteur et le post-digesteur.

Sur l'ensemble des sites du projet MethaSeq, 3 espèces principales d'*Enterococcus* spp. sont retrouvées dans les échantillons analysés ; il s'agit de *E. faecium* (95% des échantillons), *E. faecalis* (70% des échantillons) et *E. cecorum* (95% des échantillons) qui persistent en thermophilie et après l'étape de pasteurisation du site 5.

C. perfringens ainsi que *C. botulinum* sont détectés dans les compartiments de préparation des substrats et du digesteur dans tous les sites excepté le site 4, dans des abondances cependant très faibles (inférieures à 0,025 % des séquences). Les résultats de séquençage Shotgun montrent également la présence de *E. coli* dans l'ensemble des compartiments de préparation des substrats et des digestats. On ne retrouve pas cette cible en séquençage dans les compartiments digesteurs des sites 1 et 3, alors qu'elle est quantifiée par ddPCR dans les mêmes échantillons. Le séquençage Shotgun est moins sensible que la méthode de quantification (ddPCR). Son intérêt réside dans sa forte capacité exploratoire qui permet en une analyse de cibler un très grand nombre d'espèces pathogènes potentiellement présentes. Il permet également d'identifier les espèces présentes au sein d'un genre microbien d'intérêt. Ainsi, le genre *Salmonella* est principalement représenté par l'espèce *S. enterica* que l'on détecte dans des abondances cependant faibles (inférieure à 0,0047% des séquences) dans les compartiments digestat ou post-digestat des sites 1,2 et 4. Pour le site 5, traitant les biodéchets, *S. enterica* est détectée dans l'ensemble des compartiments hors digesteurs et une autre espèce (notée *Salmonella* sp.) dans la cuve tampon, dans des abondances inférieures à 0,004% des séquences. *S. aureus* est retrouvé dans les 4 compartiments du site 5 dans des abondances inférieures à 0,012% des séquences. Aucun *Mycobacterium tuberculosis* n'est retrouvé dans les échantillons de l'étude.

5 Conclusions et discussion par cibles d'intérêt



Enterococcus spp.

Les données du projet ont permis d'améliorer nos connaissances sur les entérocoques présents dans les digesteurs, et en particulier la prévalence d'*Enterococcus cecorum*, peu référencé sur la filière méthanisation. *Enterococcus cecorum*, qui était auparavant classé comme streptocoque, a été décrit pour la première fois en 1983 comme une nouvelle espèce d'entérocoque provenant des intestins de poulets. Il a été mis en cause dans des foyers de maladie chez les poulets de chair caractérisés par une septicémie, une péricardite, une myosite locale et, plus particulièrement, des lésions osseuses et articulaires (Kense & Landman, 2011).

Les entérocoques font partie des écosystèmes microbiens digestifs des animaux et servent d'indicateurs de contamination fécale dans les eaux de baignades (référence USEPA 35 UFC/100ML), et comme indicateur de l'efficacité du traitement lors du traitement des eaux usées, du compostage ou de la méthanisation. (Byappanahalli et al). La présence d'*Enterococcus cecorum* a été documentée dans des digesteurs à l'échelle laboratoire traitant un mélange d'ensilage de maïs, de sorgho et de fumier de porc (et donc en absence de fumier de volaille) (Acs et al., 2015). Il semble important de d'approfondir le devenir de cette espèce sur la filière de méthanisation. Trois espèces d'*Enterococcus* sont retrouvées principalement dans les échantillons : *E. faecium* (95% des échantillons), *E. faecalis* (70% des échantillons) et *E. cecorum* (95% des échantillons). *E. faecium* et *E. faecalis* sont les espèces étudiées dans les études sur le devenir des contaminants microbiologiques lors de la méthanisation (Ademe, Projet PathoGaz). La prévalence de *E. cecorum* est plus rarement rapportée. On observe également dans la filière en thermophilie en présence de concentrations élevées ($1,24 \cdot 10^6$ copies de gènes/g).

E.coli

Comme les entérocoques, *E. coli* fait partie de la flore commensale intestinale (Jang et al, 2017), et est utilisée comme indicateur de contamination fécale dans l'environnement ou indicateur de traitement. Seules certaines souches sont pathogènes.

E. coli est retrouvée dans 100% des échantillons (en ddPCR ou en DeepSG) mais dans certains cas, l'espèce n'est pas détectée par l'une des méthodes (6/20). La concentration maximale est mesurée dans le compartiment d'hydrolyse ($4,2 \cdot 10^4$ copies de gènes/g) du site 1. Sur les autres échantillons, la concentration varie entre $1,1 \cdot 10^1$ et $5,7 \cdot 10^3$. *E. coli* est encore quantifiable dans les digesteurs (4 sites/5) et post-digesteurs (5 sites/5).

Listeria monocytogenes

Elle n'est pas retrouvée en culture dans notre étude, et est quantifiée uniquement par ddPCR dans les compartiments amont du digesteur ainsi que dans le digesteur du site 2. Cependant on la retrouve par séquençage dans 95% des échantillons dans des abondances extrêmement faibles. Sa présence dans les digestats de méthaniseurs agricoles a été mise en évidence par Orzi et al (2015) et Pourcher et al (2023). Ces derniers rapportent des concentrations dans les digestats de 3 méthaniseurs mésophiles comprises entre 0,6 et 240 NPP/g.

Salmonella enterica

Cette espèce n'est pas retrouvée en culture dans les échantillons analysés, cependant elle est quantifiée en ddPCR et détectée en séquençage uniquement dans les compartiments amont traitant des biodéchets.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens, bactérie anaérobie stricte, formant des spores est retrouvée en culture dans 14/20 échantillons et quantifiée en ddPCR dans 15/20 éch. Le séquençage confirme cette prévalence. *Clostridium botulinum* est également présent dans 50% des échantillons. Une spécificité par rapport aux autres bactéries étudiées est que sur plusieurs sites, la concentration en *C. perfringens* est supérieure dans le post-digesteur à celle du digesteur (figure ci-dessus).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est retrouvé dans des abondances plus hautes (0,0118% et 0,0122%) dans les compartiments amont du digesteur traitant les biodéchets (site 5). *S. aureus* est une espèce commensale du microbiome humain, en particulier cutané (Byrd et al, 2018). Parmi l'ensemble des substrats utilisés par les filières de cette étude, seuls ceux traités par le site 5 sont plus fortement impactés par les microbiotes humains qui pourraient expliquer la présence de cette espèce dans le substrat.

Mycobacterium avium

Aucun *Mycobacterium* n'est retrouvé en séquençage dans les échantillons.

6 Conclusions et discussion par substrats et procédés

Les résultats de séquençage Shotgun montrent, comme attendu, un écosystème microbien complexe dans les échantillons de la filière de méthanisation, avec un nombre d'espèces moléculaires (OTU) allant de 1029 OTU à 2680 OTU, avec des valeurs maximales mesurées dans les digestats, toutes supérieures à 2138 OTU. Seul le digestat du site 3 présente un nombre d'OTU inférieur (1391 OTU), ce qui pourrait être lié aux conditions de gestion du digestat (digestat est stocké puis vidangé 2 fois par an).

Le site alimenté avec des biodéchets présente des caractéristiques microbiologiques particulières par rapport aux autres sites. Notamment, les résultats montrent un doublement de la richesse bactérienne après l'hydrolyse, liée probablement à l'augmentation du pH à une valeur plus en adéquation avec les développements microbiens. Les compartiments liés à l'hydrolyse montrent également une grande diversité au sein du genre *Enterococcus* (17/75 dans la taxonomie Genbank) et d'espèces pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*). Sur ce site, les 5 cibles réglementaires sont quantifiées dans les compartiments en amont du digesteur, ce qui permet de conclure qu'il est important d'étudier les abattements de microorganismes pathogènes dans les filières de traitement des biodéchets par méthanisation. Il faut noter que le digesteur traitant les biodéchets est celui présentant la plus forte richesse bactérienne, ce qui favorise la pression biotique et donc l'inactivation des espèces pathogènes.

Enfin, sur les 4 sites dérogatoires qui regroupent les substrats de plusieurs fermes, les résultats confirment qu'il n'y a pas de dangers supplémentaires identifiés en termes d'espèces pathogènes présentes ou de leur concentration.

Au regard des résultats de séquençage de cette étude, aucune diminution de la richesse n'est mesurée avec la thermophilie (site 1) ou le traitement de pasteurisation (site 5). Les résultats de ddPCR confirment cette observation, la thermophilie telle qu'elle est conduite sur ce site ne semble pas diminuer les diversités et les concentrations des indicateurs microbiologiques réglementaires retrouvés.

Si il est reconnu que la digestion anaérobie thermophile élimine plus efficacement *E. coli* et les salmonelles que le traitement mésophile, l'effet de la température reste très variable en fonction des espèces pathogènes, y compris au sein des bactéries. Ainsi, si les *Actinomycetales*, *Salmonella spp.* et *Salmonella typhimurium* sont éradiquées, *Enterococcus*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* sont uniquement partiellement éliminés, et *Yersinia enterocolitica* se maintient dans les digesteurs, selon la review de Zhao et Liu (2019).

Des écarts importants sont observés lors du projet MethaSeq entre la quantification par ddPCR (peu d'abattement) et les analyses culturales (plusieurs Log d'abattement) lors des traitements en condition thermophile ou dans le traitement d'hydrolyse. De tels écarts sont également rapportés dans la littérature. Svennevik et al. (2021) ont utilisé la ddPCR pour quantifier *E. coli* lors de différents traitements de méthanisation. Après méthanisation thermophile (55°C), la concentration est de 10⁶ copies/gMS, alors qu'elle est en dessous de 100 NPP/gMS par technique de culture.

Cet écart peut s'expliquer 1) soit par une surestimation de la concentration par ddPCR, les fortes températures ou les faibles pH limitant le recyclage de l'ADN génomique des cellules bactériennes inactivées ; ainsi, une faible activité des DNAses aux pH inférieurs à 4 (comme dans le cas de l'hydrolyse du site 5) a été démontrée (quote ref), 2) soit par une sous-estimation des concentrations par les méthodes culturales induite par une perte de cultivabilité suite au stress thermique (Flores-Ramírez et al., 2023). Il est difficile dans le cadre du projet de conclure quant à ces deux hypothèses, chacune faisant débat au sein de la communauté scientifique. L'inactivation de *E. coli* au sein d'un digesteur à taille réelle n'est pas la même qu'en culture pure au laboratoire.

Certaines études ont mesuré dans des digesteurs des concentrations de *E. coli* totales (qPCR) et viables (culture) très proches les unes des autres (égales ou différence <1 unité log₁₀ UFC/mL) (Ruiké et al, 2016). Aucune présence significative de cellules mortes, malgré les conditions thermophiles appliquées, n'a été rapporté, ce qui selon certains auteurs peut s'expliquer, par la forte activité métabolique du consortium microbien dans le réacteur TAD, qui a effectivement dégradé les cellules endommagées et l'ADN extracellulaire (Flores-Ramírez et al., 2023).

7 Conclusions et discussion sur les méthodologies utilisées

ddPCR :

Le suivi de cibles microbiennes par outils moléculaires sur la filière méthanisation reste rare, la plupart des études utilisant les méthodes normatives basées sur les enrichissements par culture. Certains auteurs privilégient néanmoins la PCR, ce qui selon certains chercheurs permettrait de s'affranchir des pertes de cultivabilité observées pour plusieurs espèces (Higgins et al., 2007 ; Maynaud et al., 2016, Svennevik et al., 2021).

Les quantifications par ddPCR apparaissent dans cette étude comme concluantes. Les résultats sont indépendants de la cultivabilité des cibles d'intérêt, et les essais peuvent facilement être reproduits si besoin, adaptés au seuil demandé et intégrer de nouvelles cibles d'intérêt. En effet, les quantifications sont possibles sans dilution pour tous les échantillons. Cependant, pour quantifier les bactéries totales, très concentrées dans ces filières, la ddPCR n'est pas adaptée, car il faut réaliser un nombre élevé de tests de dilution afin de valider la mesure par ddPCR, ce qui représente un surcout important. Pour cette cible, la qPCR reste indiquée. Les limites de détection et de quantification sont très basses et très facilement adaptables du fait de la flexibilité dans l'ajout de puits d'essai (LQ > 1,1 copies de gènes par g de MF).

Rapide et facilement paramétrable, pour un coût faible, cette technique se développe en environnement, notamment dans la surveillance de la qualité des eaux (Absolute Quantification of Enterococcal 23S rRNA Gene Using Digital PCR, Wang et al, 2016), L'activité des cellules cibles peut également être quantifiée par RT-qPCR et par ddPCR (Abberton et al. 2016).

Séquençage Deep Shotgun :

Le séquençage Shotgun permet d'élargir considérablement la liste des cibles recherchées, et d'aller au-delà de quelques indicateurs de traitement. En effet, les liens entre survie des indicateurs et survie des pathogènes sont soumis à débat, et rechercher directement les espèces pathogènes améliorerait l'évaluation des dangers. Par ailleurs, travailler sur le génome environnemental (ou 'eDNA') sans

PCR spécifique, permet de rechercher dans une même analyse des organismes éloignés taxonomiquement : virus, bactéries, parasites.

Le séquençage Deep shotgun a permis d'obtenir 2,2 Md de séquences soit 786 Gb de données. La mise en œuvre est facile sur ce type de matrice et très informative avec une profondeur de 50M de séquences. Cette profondeur peut-être facilement augmentée ou diminuée en fonction de l'abondance de la cible recherchée. Le Shotgun a permis dans cette étude de mettre en évidence la diversité des *Enterococcus* spp. de la filière biodéchets et la fréquence des espèces *E. cecorum* et *faecium* dans les différentes filières ainsi que l'absence de *Mycobacterium* spp., indépendamment de leur cultivabilité. Cela confère un avantage pour le monitoring environnemental, car certaines espèces pathogènes peuvent perdre leur capacité à se multiplier dans les milieux de culture lorsqu'elles sont soumises à des stress environnementaux. Enfin, cette technologie, associée à une analyse bioinformatique spécifique, permet la caractérisation de la diversité microbienne dans son ensemble, des fonctions présentes et des gènes d'intérêts (virulence, antibiorésistance...), autres indicateurs microbiologiques. Ainsi, si les parasites et les virus ne faisaient pas partie des cibles choisies pour cette étude, le Deep Shotgun peut permettre d'évaluer la présence de certains d'entre eux (virus à ADN).

L'application en diagnostic médical ou environnement est encore difficilement possible car cette application nécessite des outils spécifiques, une expertise forte, la définition de seuils et le délai reste élevé. Cependant, le Réseau GIS Obépine qui coordonne la surveillance des eaux de STEP en France, fort du succès des protocoles appliqués lors de la crise Covid va développer ces outils sur d'autres cibles (Publication Janvier 2023).

Une synthèse publiée dans la revue Environnement Risques Santé en 2020 fait état du manque de connaissances scientifiques sur le devenir de certains pathogènes sur la filière de méthanisation des déchets organiques, la plupart des études s'intéressant toujours aux mêmes espèces. Elle propose une liste de pathogènes à étudier, regroupant des virus et des bactéries, et l'approche Shotgun serait particulièrement intéressante dans cet objectif.

Cette liste est la suivante : virus de l'hépatite A, *norovirus*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* (A, B, C), *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Bacillus cereus*. Il est vrai toutefois que les limites de détection pourraient limiter les possibilités d'atteindre toutes ces cibles, très minoritaires dans les matrices de la filière méthanisation.

8 Conclusion générale

Cette étude est la première tirant partie du potentiel des outils moléculaires de dernière génération pour explorer la capacité hygiénisante de certaines étapes du process de méthanisation. La ddPCR a été créé en 2011 et est déjà utilisée en monitoring environnemental comme méthode alternative à la qPCR dans la réglementation américaine. Le développement du deep-shotgun est fortement lié à l'apparition des séquenceurs de 2^{ème} et 3^{ème} génération, produisant des milliards de séquences avec une qualité élevée. Il est aujourd'hui l'outil de choix pour caractériser les communautés microbiennes indépendamment de leur capacité à être cultivées. Peu utilisé en diagnostic environnemental du fait de son coût et des délais plus long, il est toutefois l'étape incontournable pour identifier de nouveaux marqueurs taxonomiques ou fonctionnels qui permettent, eux, des alertes et une gestion rapide du risque microbien.

Le projet a également permis de valider un nouveau protocole d'extraction d'ADN génomique sur des échantillons de la filière de méthanisation, pré-requis important à l'utilisation de ces outils. Même si l'effort d'échantillonnage était insuffisant pour pouvoir calculer des abattements ou généraliser quant à la capacité hygiénisante de tel ou tel pré- ou post-traitement, ce travail constitue une réelle avancée méthodologique. Il a permis de faire la démonstration de l'intérêt d'une méthode de quantification, la ddPCR (avec des seuils de quantification et des risques d'erreur d'interprétation minimisés par rapport à certaines techniques culturales utilisées aujourd'hui) combinée à une technique d'analyse de la diversité des espèces pathogènes présentes, là encore avec une identification fiable au seuil de l'espèce. Les résultats apportent également des éléments de compréhension concernant la dynamique de certaines bactéries après méthanisation (post-digestion et stockage).

La combinaison de la ddPCR et du séquençage Deep Shotgun permettra d'améliorer significativement notre vision des dangers associés à la présence de pathogènes dans les digestats et des traitements hygiénisants sur la filière. Il faut rappeler ici que présence d'un pathogène ne signifie pas nécessairement risque sanitaire, et que les voies d'exposition (entre autres), doivent être prises en compte. Enfin, il est important de mettre en regard les concentrations en pathogènes dans les digestats à celles retrouvées dans les sols (bruit de fond environnemental).

Liste des figures

Figure 1 : Description des tâches du projet MethaSeq.....	8
Figure 2: Schéma illustrant les différentes étapes du procédé de méthanisation	9
Figure 3 : Quantification des bactéries totales par qPCR et des cibles réglementaires par ddPCR du site 2	34
Figure 4 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 2	35
Figure 5 : Quantification des Bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 3	35
Figure 6 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 3	36
Figure 7 : Quantification des bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 4.....	37
Figure 8 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 4	37
Figure 9 : Quantification des bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 1.....	38
Figure 10 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 1	39
Figure 11 : Quantification des bactéries totales par qPCR et cibles réglementaires par ddPCR du site 5.....	40
Figure 12 : Mesure des indices de Shannon (équitabilité) et d'alphadiversité Sobs (Nombre d'OTU) du site 5	40
Figure 13 : Comparaison des abondances relatives (% de séquences) des cibles d'intérêt dans l'ensemble des échantillons.	42

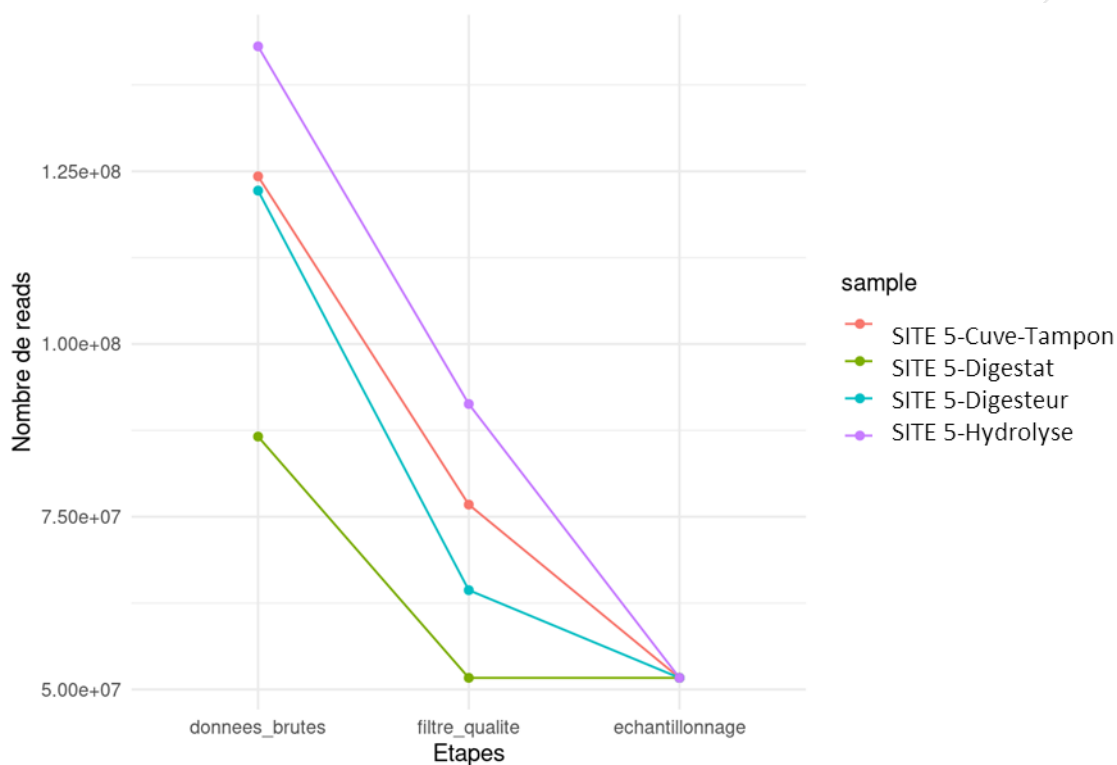
Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des mesures et méthodes physico-chimiques	13
Tableau 2 Cibles et Normes réglementaires appliquées	14
Tableau 3 : Plan d'échantillonnage des analyses microbiologiques	14
Tableau 4 : Caractérisation physicochimique de l'unité de traitement du site 1	18
Tableau 5 : Caractérisation physicochimique de l'unité de traitement du site 2	21
Tableau 6 : Caractérisation physicochimiques de l'unité de traitement du site 3.....	23
Tableau 7 : Caractérisation physicochimiques de l'unité de traitement du site 4.....	26
Tableau 4 : Caractérisation physicochimique de l'unité de traitement du site 5	29
Tableau 8: Contrôle qualité des ADNs	31
Tableau 9: Concentrations des cibles mesurées par les méthodes réglementaires.....	32
Tableau 11: Concentrations en copies de gènes codant pour l'ARNr 16S (Bactéries totales) par qPCR.	33
Tableau 10 : Comparaison des distances Bray-curtis exprimée en %	41

Annexes

Résultat du run 1 : Ligne S4 Novaseq 6000

sample	reads	format	type	num_seqs	sum_len	min_len	avg_len	max_len
SITE 5-Cuve-Tampon	R1	FASTQ	DNA	51684908	7492825113	80	145	150
SITE 5-Cuve-Tampon	R2	FASTQ	DNA	51684908	7228243958	80	139.9	150
SITE 5-Digesteur	R1	FASTQ	DNA	51684908	7496183532	80	145	150
SITE 5-Digesteur	R2	FASTQ	DNA	51684908	7004885513	80	135.5	150
SITE 5-Digestat	R1	FASTQ	DNA	51684908	7485225342	80	144.8	150
SITE 5-Digestat	R2	FASTQ	DNA	51684908	7161260536	80	138.6	150
SITE 5-Hydrolyse	R1	FASTQ	DNA	51684908	7490099805	80	144.9	150
SITE 5-Hydrolyse	R2	FASTQ	DNA	51684908	7292639853	80	141.1	150



Résultat du run 2 : Ligne S4 Novaseq 6000

sample	reads	format	type	num_seqs	sum_len	min_len	avg_len	max_len
SITE 4-Post-digesteur	R1	FASTQ	DNA	50000000	7010723035	80	140.2	150
SITE 4-Post-digesteur	R2	FASTQ	DNA	50000000	6730995818	80	134.6	150
SITE 4-Digesteur	R1	FASTQ	DNA	37441571	5254647084	80	140.3	150
SITE 4-Digesteur	R2	FASTQ	DNA	37441571	4972400940	80	132.8	150
SITE 4-Digestat-solide	R1	FASTQ	DNA	50000000	7064904906	80	141.3	150
SITE 4-Digestat-solide	R2	FASTQ	DNA	50000000	6852950771	80	137.1	150
SITE 4-Digestat-liquide	R1	FASTQ	DNA	50000000	6963213350	80	139.3	150
SITE 4-Digestat-liquide	R2	FASTQ	DNA	50000000	6726324111	80	134.5	150
SITE 1-Post-Digesteur	R1	FASTQ	DNA	50000000	6997722914	80	140	150
SITE 1-Post-Digesteur	R2	FASTQ	DNA	50000000	6847317828	80	136.9	150
SITE 1-fosse-de-stockage	R1	FASTQ	DNA	45713071	6379467837	80	139.6	150
SITE 1-fosse-de-stockage	R2	FASTQ	DNA	45713071	6208615893	80	135.8	150
SITE 1-Digesteur	R1	FASTQ	DNA	50000000	6991935060	80	139.8	150
SITE 1-Digesteur	R2	FASTQ	DNA	50000000	6754588097	80	135.1	150
SITE 1-Digestat	R1	FASTQ	DNA	50000000	6964297371	80	139.3	150
SITE 1-Digestat	R2	FASTQ	DNA	50000000	6796174281	80	135.9	150
SITE 3-Prefosse	R1	FASTQ	DNA	50000000	6976473422	80	139.5	150
SITE 3-Prefosse	R2	FASTQ	DNA	50000000	6714462006	80	134.3	150
SITE 3-post-digesteur	R1	FASTQ	DNA	50000000	6975186881	80	139.5	150
SITE 3-post-digesteur	R2	FASTQ	DNA	50000000	6770246750	80	135.4	150
SITE 3-Digesteur	R1	FASTQ	DNA	50000000	6946338694	80	138.9	150
SITE 3-Digesteur	R2	FASTQ	DNA	50000000	6772428453	80	135.4	150
SITE 3-Digestat	R1	FASTQ	DNA	31521157	4383167254	80	139.1	150
SITE 3-Digestat	R2	FASTQ	DNA	31521157	4281752780	80	135.8	150
SITE 2-Post-digesteur-ADN	R1	FASTQ	DNA	50000000	7004536607	80	140.1	150
SITE 2-Post-digesteur-ADN	R2	FASTQ	DNA	50000000	6771832135	80	135.4	150
SITE 2-Digesteur-ADN	R1	FASTQ	DNA	50000000	6963771605	80	139.3	150
SITE 2-Digesteur-ADN	R2	FASTQ	DNA	50000000	6797289918	80	135.9	150
SITE 2-Digestat-solide-ADN	R1	FASTQ	DNA	50000000	7002270740	80	140	150
SITE 2-Digestat-solide-ADN	R2	FASTQ	DNA	50000000	6913258207	80	138.3	150
SITE 2-Digestat-liquide-ADN	R1	FASTQ	DNA	50000000	7019841605	80	140.4	150
SITE 2-Digestat-liquide-ADN	R2	FASTQ	DNA	50000000	6704223893	80	134.1	150

FastQC: Per Sequence GC Content

