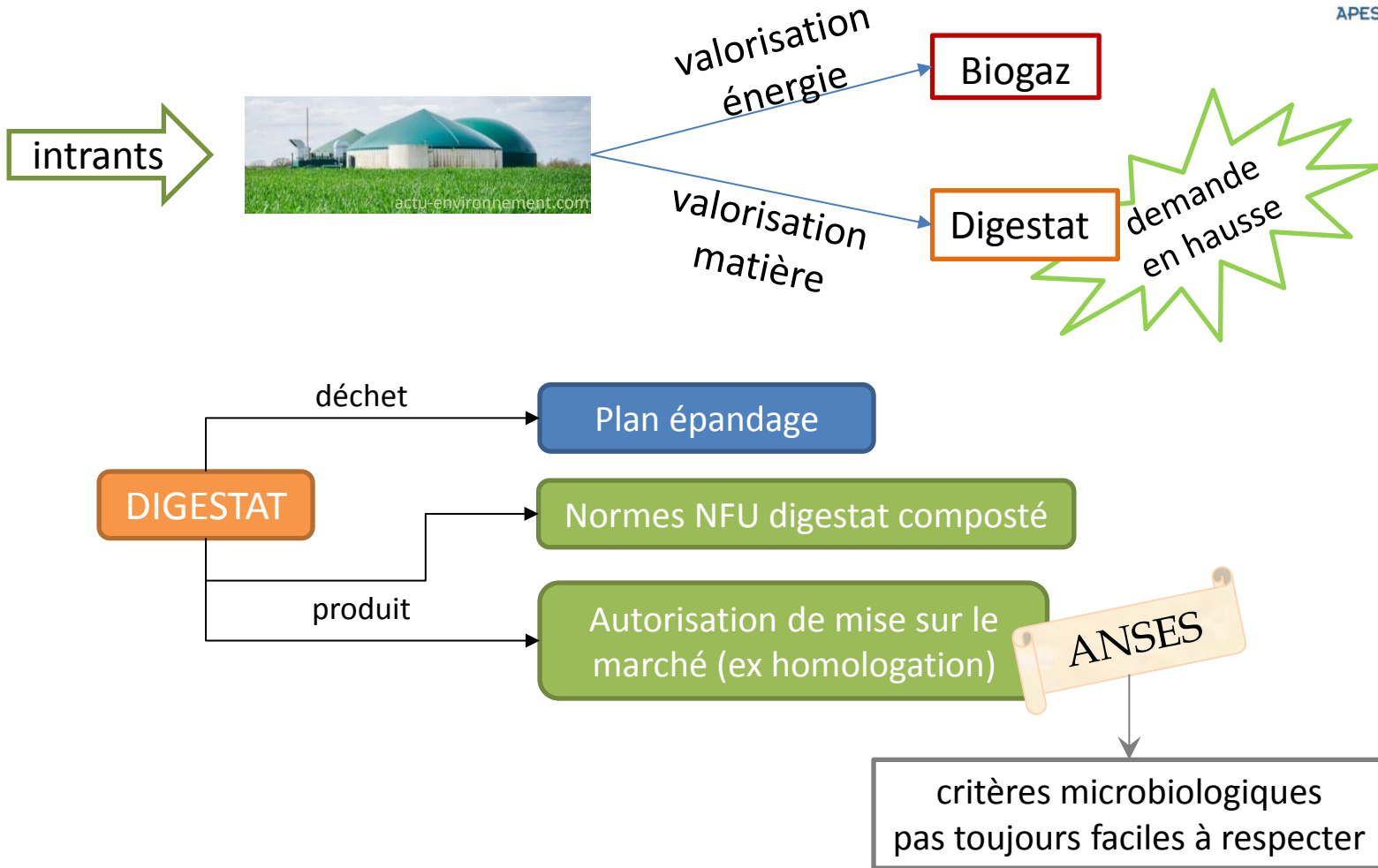


Caractérisation microbiologique d'un digestat dans un essai pilote : identification de points de blocage en vue de l'homologation

J-François Lascourrèges*

C.Lagnet, M.Cordelier, P.Pouech

* Correspondant pour la publication : jeanfrancois.lascourreges@apesa.fr, +33 (0)6 14 24 32 61



Notre objectif :

Apporter aux porteurs de projet dans le cadre restreint d'un essai pilote avec contraintes de temps et de budget une évaluation fiable des caractéristiques microbiologiques

Essai pilote

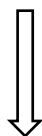
- Fermenteur :
 - cuve cylindrique à 40°C, 20 litres de volume utile, agitation mécanique continue, alimentation quotidienne
- Objet de l'essai:
 - Fonctionnement optimal du digesteur
 - Différentes phases d'alimentation
 - Rendements de production de biogaz
 - Caractéristiques physico-chimiques du digestat

Prélèvements d'échantillons
pour analyses microbiologiques



Echantillonnage

| | Démarrage | Phase 1 | Phase 2 | Phase 3 |
|-----------|---|--|--|---|
| Substrats | Inoculum adapté : (boues de STEP et déchets verts) | Mélange : Fumier bovin, produits déconditionnés, ensilage | Mélange : Fumier bovin, produits déconditionnés, ensilage, menues pailles | Digestat brut de l'unité industrielle (décongelé) |
| Durée | | 6 semaines | 6 semaines | 6 semaines |



Inoculum
n=3 échantillons



Pour chaque phase:

- ✓ Intrants à t0
- ✓ Intrants après stockage (différentes modalités)
- ✓ Digestat à t0
- ✓ Digestats à t+10 jours
- ✓ Digestat à t+6 semaines

n=1 échantillon

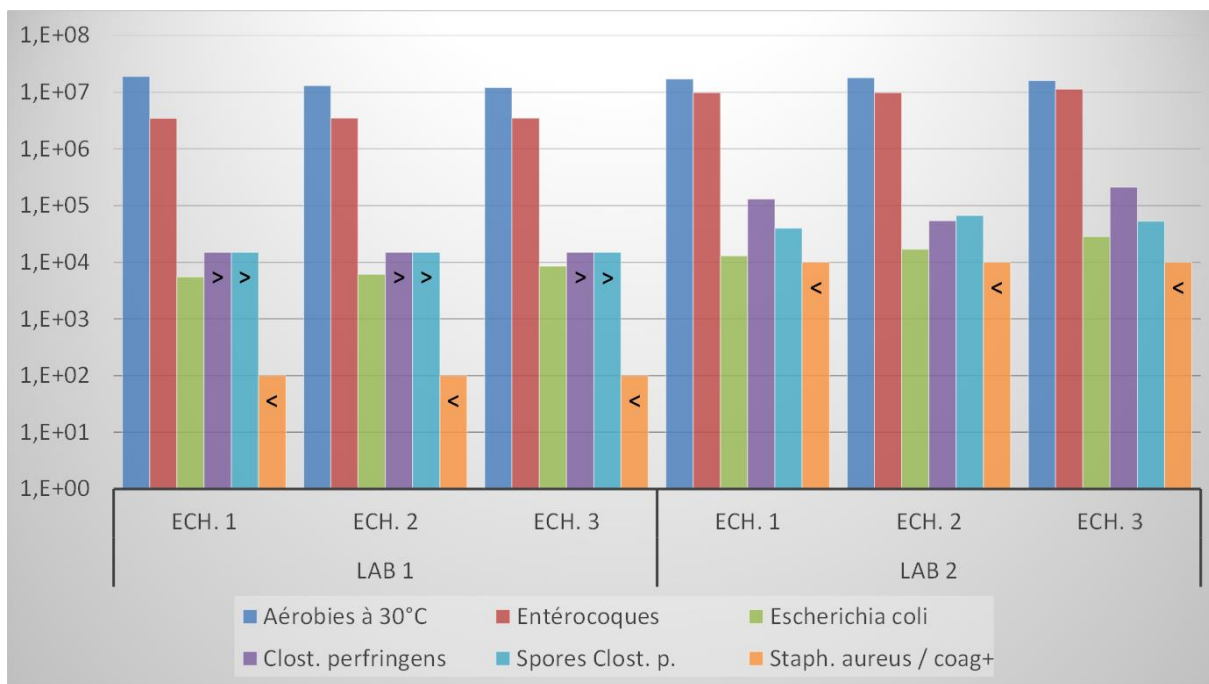
Laboratoires et normes d'analyse

| Microorganismes | Laboratoire 1 | Laboratoire 2 |
|----------------------------------|-----------------|-------------------|
| Entérocoques | ISO 7899-1 | ISO 7899-1 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | NF 08-056 mod V | ISO 7937 |
| Spores <i>Clost. perfringens</i> | NF 08-056 mod V | ISO 7937 |
| Aérobies à 30°C | ISO 4833-1 | NF V 08-051 |
| <i>Staph. aureus</i> / coag+ | NF 08-057-1 V | ISO 6888-2* |
| <i>Escherichia coli</i> | ISO 16649-2 V | FD CEN/TR 15214-2 |
| <i>Salmonella</i> | ISO 6579 V | ISO 6579 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | LV 02-9802 | ISO 11290-1/A1 |
| <i>Aspergillus</i> | LV 02-9701 | |

*norme ISO 6888-1 recommandée par l'ANSES

- Laboratoire 1 : Pas de dénombrement des *Clostridium* si > 15000 bact./g
- Staphylocoques : quelle que soit la norme, la charge microbienne et les dilutions nécessaires rendent impossible le dénombrement précis

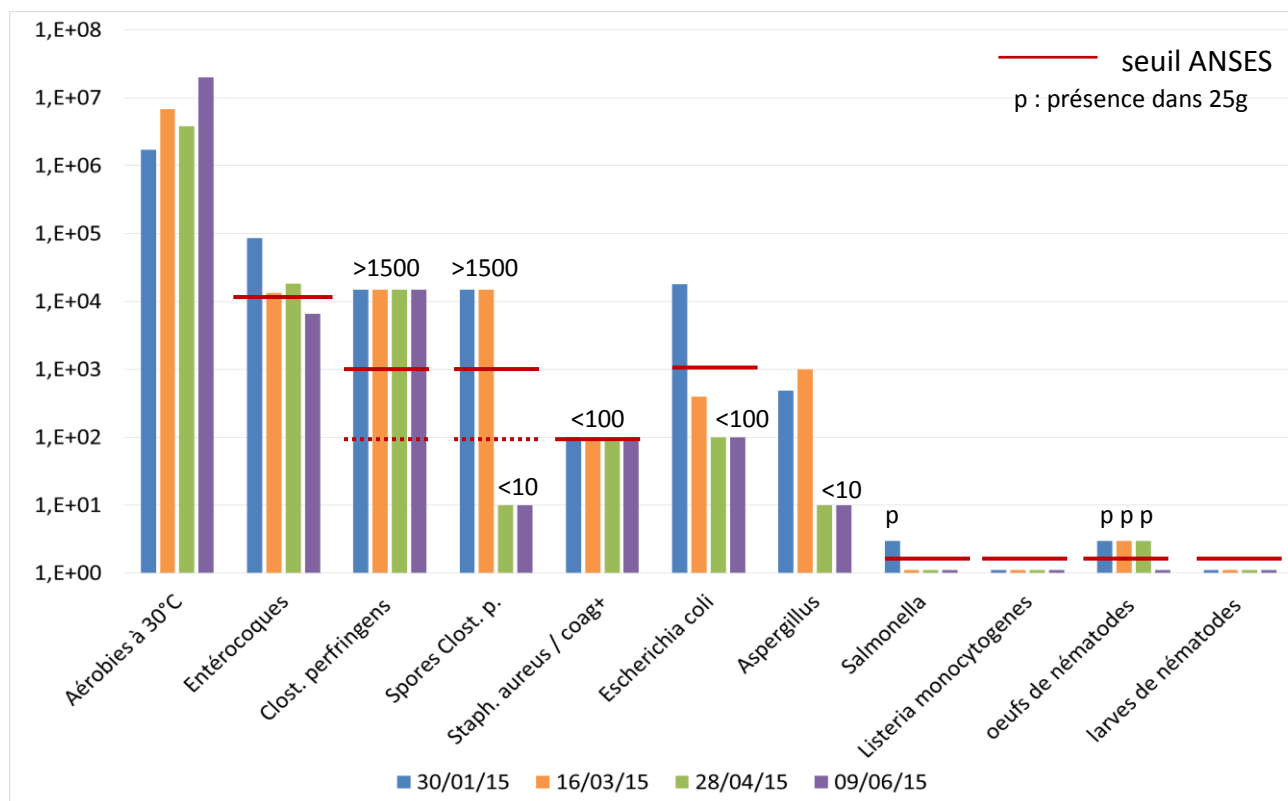
Estimation de l'homogénéité de l'échantillonnage



- Pas de différence significative ($0,1 < \text{Log (Ech.)} < 0,6$) entre les échantillons pour un même laboratoire => Homogénéité
- Le laboratoire 2 donne des résultats légèrement supérieurs mais pas de façon significative $< 0,5 \text{Log}$ pour entérocoques, *E. coli* et aérobie 30°C
- Résultats inexploitable pour les staphylocoques sur les 2 labos et pour *Clostridium* sur le labo 1⁶

Evolution de l'inoculum

Nécessité de connaître l'inoculum servant au démarrage des essais pilotes et de s'assurer de sa stabilité

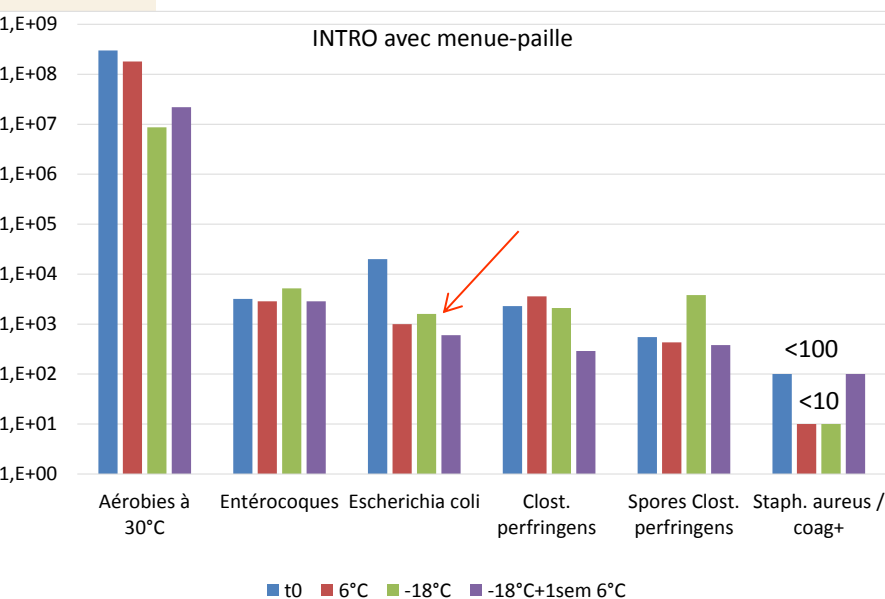
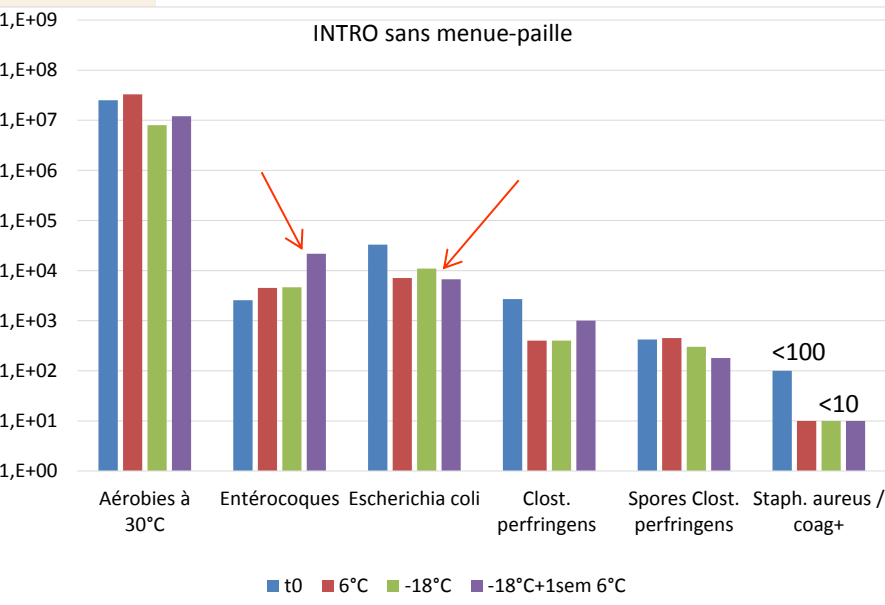


En 5 mois:

- ✓ +1 Log pour les aérobie
- ✓ -1 Log pour les entérocoques
- ✓ -2 Log pour les spores de *C. perfringens*, *E. coli* et *Aspergillus*
- ✓ Disparition de *Salmonella* et des œufs de nématodes

=> un facteur aussi important que connaître la microbiologie des intrants

Influence des conditions de stockage des intrants



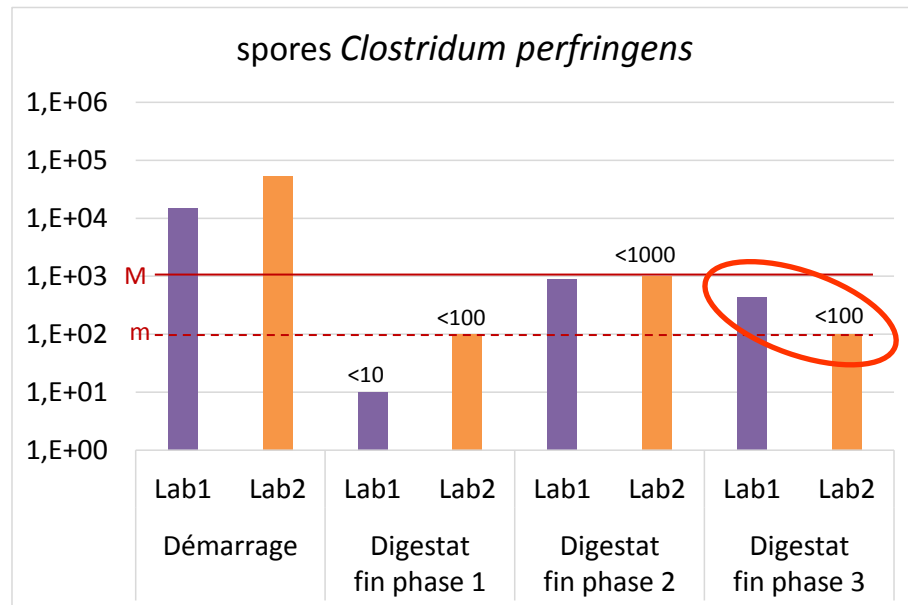
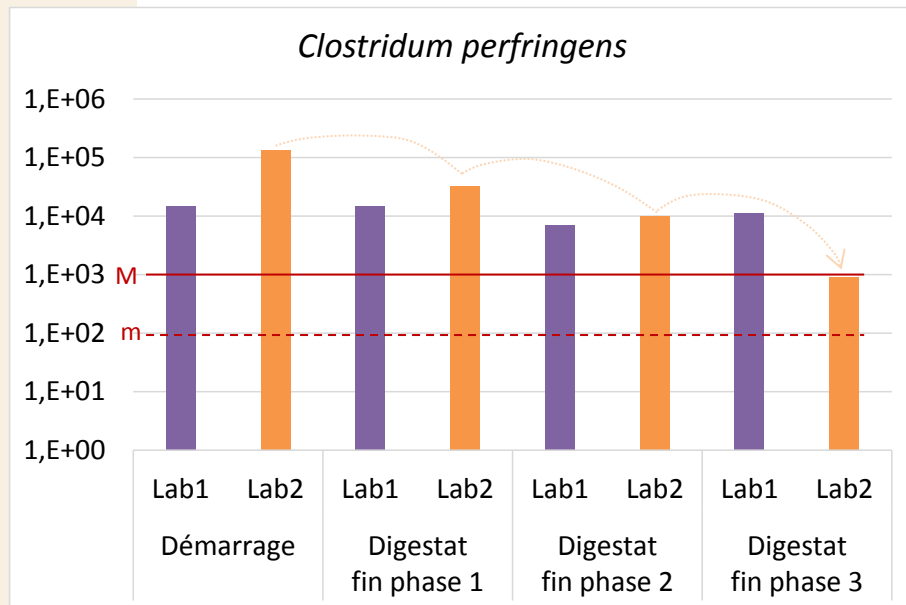
- t0 : analyse initiale
- 6°C : analyse après 6 semaines à 6°C
- -18°C : analyse après 6 semaines à -18°C
- 18°C+1sem 6°C: analyse après congélation pendant 6 semaines puis conservation 1 semaine à 6°C

Avec des variations maximales de l'ordre d'1 Log, les conditions de stockage n'ont que peu d'influence sur les dénombrements bactériens

- Pour E. coli on observe une diminution quel que soit la température de stockage (6°C, -18°C)
- Pour un des mélanges on observe une diminution des microorganismes aérobies à 30°C lors de la congélation,
- Pour les entérocoques, dans un cas le nombre de bactéries a augmenté après congélation puis stockage 1 semaine à 6°C

Clostridium sur différentes phases d'alimentation

n échantillon = 1



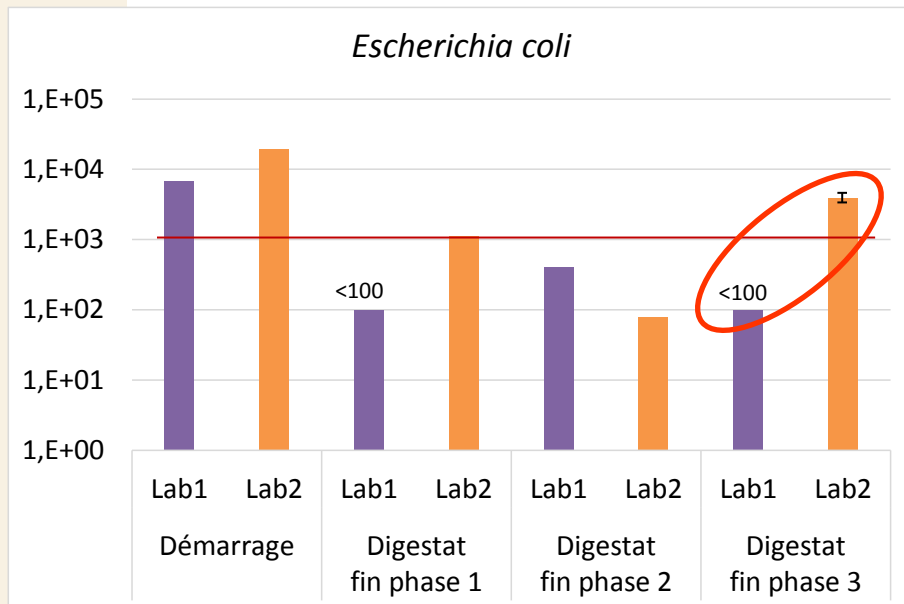
norme NF 08-056 mod V pour Lab 1

norme ISO 7937 pour Lab 2

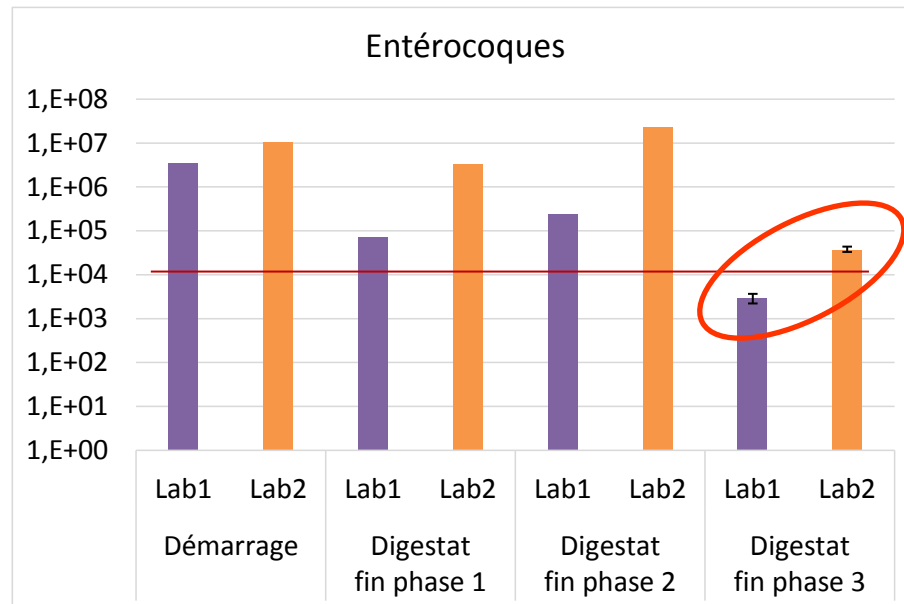
- Pour laboratoire 2 : abattement de la forme végétative
- Pour les spores : abattement par rapport au démarrage mais des variations selon les phases d'alimentation
- 1 dénombrement au dessus ou en dessous du seuil m d'acceptabilité selon le laboratoire, mais dans la marge d'incertitude => analyser plusieurs échantillons comme recommandé par l'ANSES

E. coli et entérocoques sur différentes phases d'alimentation

n échantillon = 1



norme ISO 16649-2 V pour Lab 1
méthode FD CEN/TR 15214-2 pour Lab 2



norme ISO 7899-1 pour Lab 1 et 2

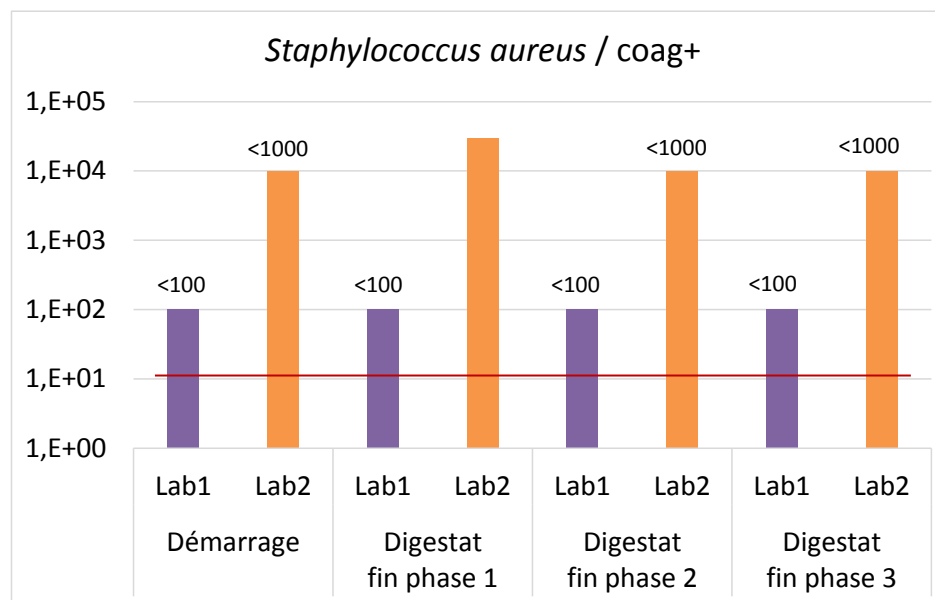
- Ecart fréquent entre les 2 laboratoires, jusqu'à 2Log pour les entérocoques
- Abattement d'*E. coli* : 1 à 2 Log selon les phases
- Abattement des entérocoques de 1 à 2 Log selon les phases et le laboratoire
- 2 dénombrements au-dessus ou en-dessous du seuil d'acceptabilité selon le laboratoire

Staphylococcus aureus sur différentes phases d'alimentation

n échantillon = 1

norme NF 08-057-1 V pour Lab 1

norme ISO 6888-2 pour Lab 2

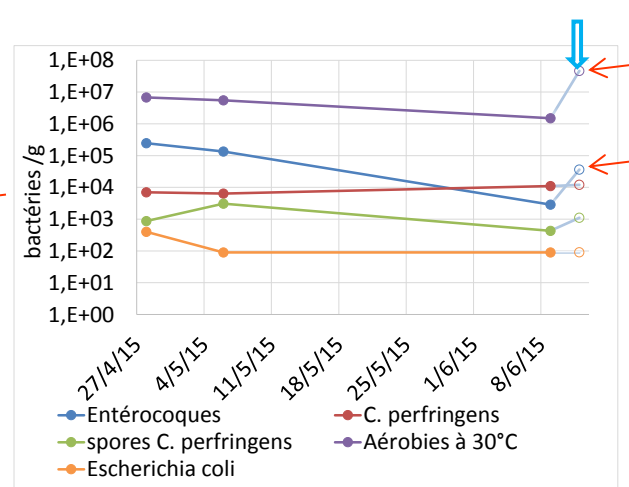
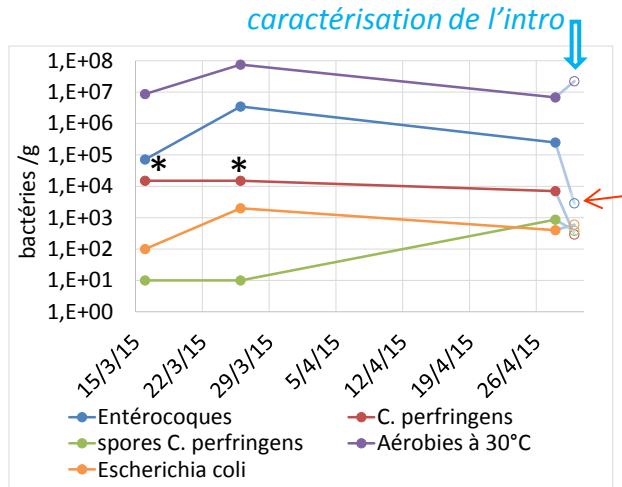
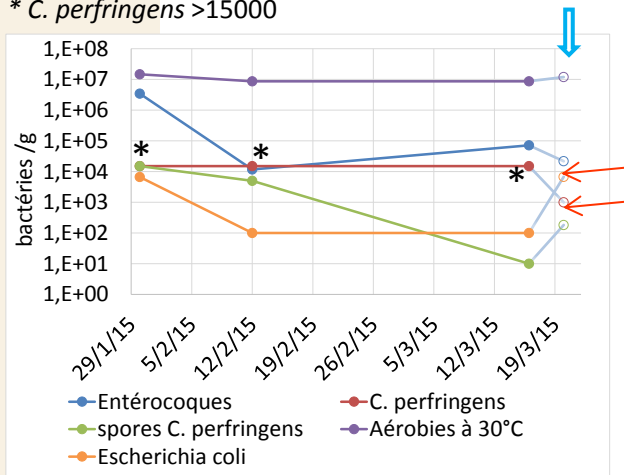


Dénombrement précis des staphylocoques impossible dans une matrice à forte charge bactérienne

=> Quelle méthode alternative?

Dynamique des populations microbiennes au cours de chaque phase

* *C. perfringens* > 15000



Phase 1 : intro sans menue-paille

Phase 2 : intro avec menue-paille

Phase 3 : intro digestat UI

- Phase 1 : Abattement dans les 10 premiers jours des entérocoques et *E. coli* puis stabilité sauf diminution des spores de *C. perfringens*
- Phase 2 : Augmentation dans les 10 premiers jours des aérobies 30°C, des entérocoques et *E. coli* puis augmentation des spores de *C. perfringens*
- Phase 3 : assez stable sauf diminution des entérocoques
- Pour 2/3 des observations, l'évolution des caractéristiques microbiologiques du digestat peut être expliquée par celles du mélange introduit quotidiennement dans le pilote. (exceptions ←)

Salmonella et Listeria levures et moisissures Nématodes

| | 30/1/15 | 27/1/15 | 16/3/15 | 27/1/15 | 28/4/15 | 28/4/15 | 9/6/15 | 9/6/15 |
|-----------------------------------|--------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| | Démarrage | INTRO sans menue-paille | digestat fin phase 1 | INTRO avec menue-paille | digestat fin phase 2 | INTRO digestat-UI | INTRO digestat-UI dégel (sem23) | digestat fin phase 3 |
| <i>Salmonella</i> | oui dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | oui dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | oui dans 25g | oui dans 25g | non dans 25g |
| <i>Aspergillus</i> | 150 | <10000 | 10 | <10000 | <400 | <10 | <50 | <10 |
| Levures et moisissures | 3 100 | >1500000 | 20 | >1500000 | 3 300 | 320 | 190 | 240 |
| Larves de nématodes | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | oui dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g |
| Œufs de nématodes | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | non dans 25g | oui dans 25g | non dans 25g | oui dans 25g | oui dans 25g |

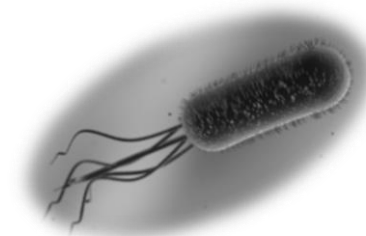
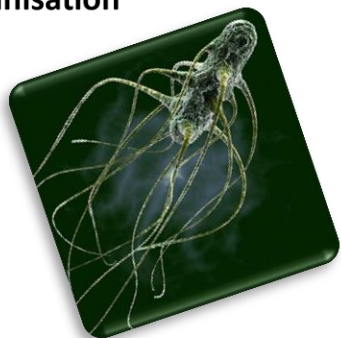
- *Salmonella* et *Listeria* sont abattues systématiquement
- Levures et moisissures, *Aspergillus* sont abattus mais ils demeurent toujours présents
- Les larves de nématodes disparaissent dans le digestat final mais les œufs persistent en fonction des apports variables dans le mélange d'introduction

Conclusion

- Bonne homogénéité de l'échantillonnage
- Sur l'ensemble des analyses, la forte charge bactérienne ne permet pas d'obtenir des dénombrements de staphylocoques pouvant être exploitables
- Pour *Clostridium perfringens* mieux vaut utiliser la norme ISO 7937 permettant d'apprécier un éventuel abattement lorsque les concentrations sont élevées
- On a observé sur des échantillons ponctuels un abattement d'1 à 2 Log pour *E. Coli*, *Clostridium perfringens* et entérocoques
- En fonction du laboratoire certains résultats apparaissaient au-dessus ou en-dessous des seuils d'acceptabilité
- *Salmonella* et *Listeria* sont abattues systématiquement
- levures et moisissures peuvent persister en faible nombre. Les œufs de nématodes sont restés présents dans les digestats contrairement aux larves.

Deux nécessités :

- Trouver une méthodologie efficiente pour le dénombrement des staphylocoques dans les digestats bruts.
- Même pour un suivi d'essai pilote :
 - plusieurs répliques => diminuer l'incertitude des dénombrements
 - plusieurs échantillons dans le temps => évaluer des tendances



Merci pour votre attention

Questions?



CONTACTS APESA :

Philippe POUECH

Responsable Pôle Technologies

Mobile : +33 (0)6 19 14 44 96

philippe.pouech@apesa.fr

Jean-François LASCOURREGES

Chef de projet

Mobile : +33 (0)6 14 24 32 61

jeanfrancois.lascourreges@apesa.fr