

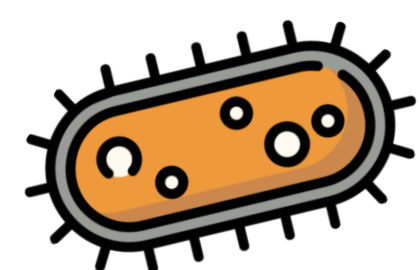
Développement d'un indicateur biologique d'efficacité d'hygiénisation pour les filières de méthanisation

M. Sanglier¹, F. Guilayn², J. Hamelin^{1*}

¹ INRAE, Univ Montpellier, LBE, 102 Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France

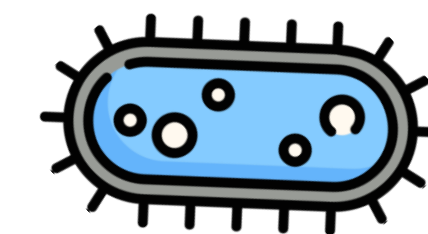
² SUEZ, CIRSEE, 78230 Le Pecq, France

*Correspondance : jerome.hamelin@inrae.fr



Clostridium perfringens : bactérie pathogène, fréquemment retrouvée dans les biodéchets et les méthaniseurs. Très résistante aux paramètres physico-chimiques propres à la méthanisation qui permettent une réduction des autres pathogènes [1] (car Gram-positif et sporulante).

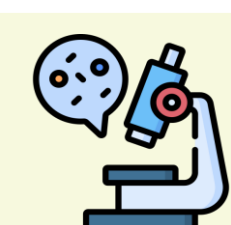
Pour la plupart des pathogènes alimentaires, il existe des **bactéries substitués** (ou *surrogates*) non-pathogènes. Elles sont utilisées pour valider et mesurer la capacité hygiénisante de procédés (surtout alimentaires) en introduisant artificiellement les substitués en amont du procédé [2]. À ce jour, aucune bactérie substitut à *C. perfringens* n'a été identifiée.



OBJECTIF DU PROJET

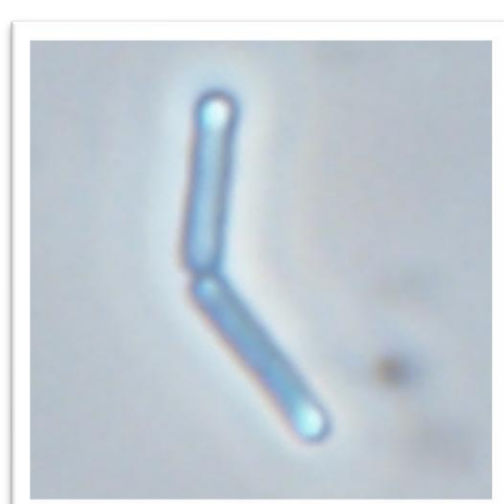
Identifier et caractériser une bactérie substitut à *C. perfringens* qui puisse être utilisée pour mesurer et comparer la capacité hygiénisante de différentes techniques de méthanisation ou différents pré/post-traitements

RÉALISATIONS & RÉSULTATS



Caractérisation d'une bactérie substitut

- Sélection d'une **espèce proche** de *C. perfringens* au niveau phylogénétique et physiologique (température et taux de croissance, profil fermentaire, niche écologique)
- Optimisation de deux **milieus de culture** : un pour l'obtention de spores (forme dormante et hautement résistante) et un autre pour l'obtention de cellules végétatives (*i.e.* non-sporulées)
- Adaptation et optimisation d'une méthode [3] pour **purifier les spores** du substitut par centrifugation isopycnique (séparation des particules par leur densité)



Développement de systèmes de détection moléculaires

- Deux couples d'amorces qPCR fonctionnant aux mêmes températures : un pour mesurer *C. perfringens*, un pour mesurer son substitut
- Cible : **gène 16S** (nombreuses copies donc meilleure sensibilité, massivement séquencé donc spécificité vérifiable *in silico*)

Pour une prise d'échantillon de 700 mg :

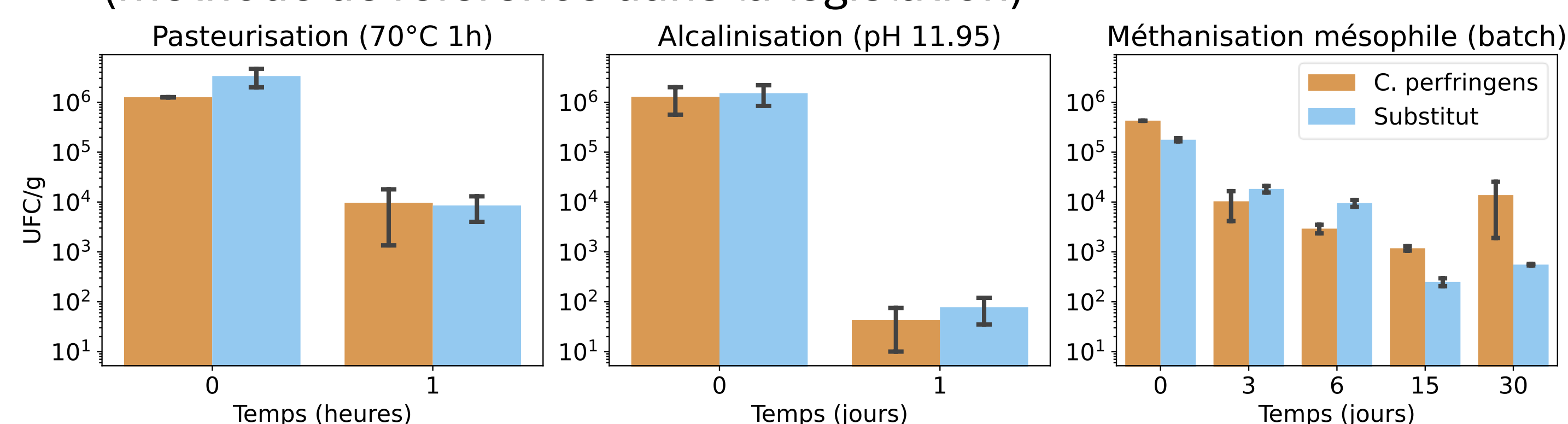
- Limite de **détection** moyenne = $2 \cdot 10^3$ bactéries / g
- Limite de **quantification** moyenne = $2 \cdot 10^4$ bactéries / g

- Vérification expérimentale de la **spécificité** par **séquencage** des produits d'amplification d'échantillons de biodéchets et de méthaniseurs échelle labo et industrielle

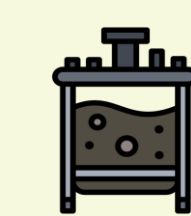


Dopages avec *C. perfringens* et son substitut

- Ajout de cultures pures de *C. perfringens* et de son substitut dans des biodéchets **pasteurisés** (70°C – 1h), du digestat **alcalinisé** (pH 11.95) ou des biodéchets soumis à un batch de **méthanisation mésophile**
- Suivi des 2 espèces bactériennes par **dénombrements culturaux** (méthode de référence dans la législation)

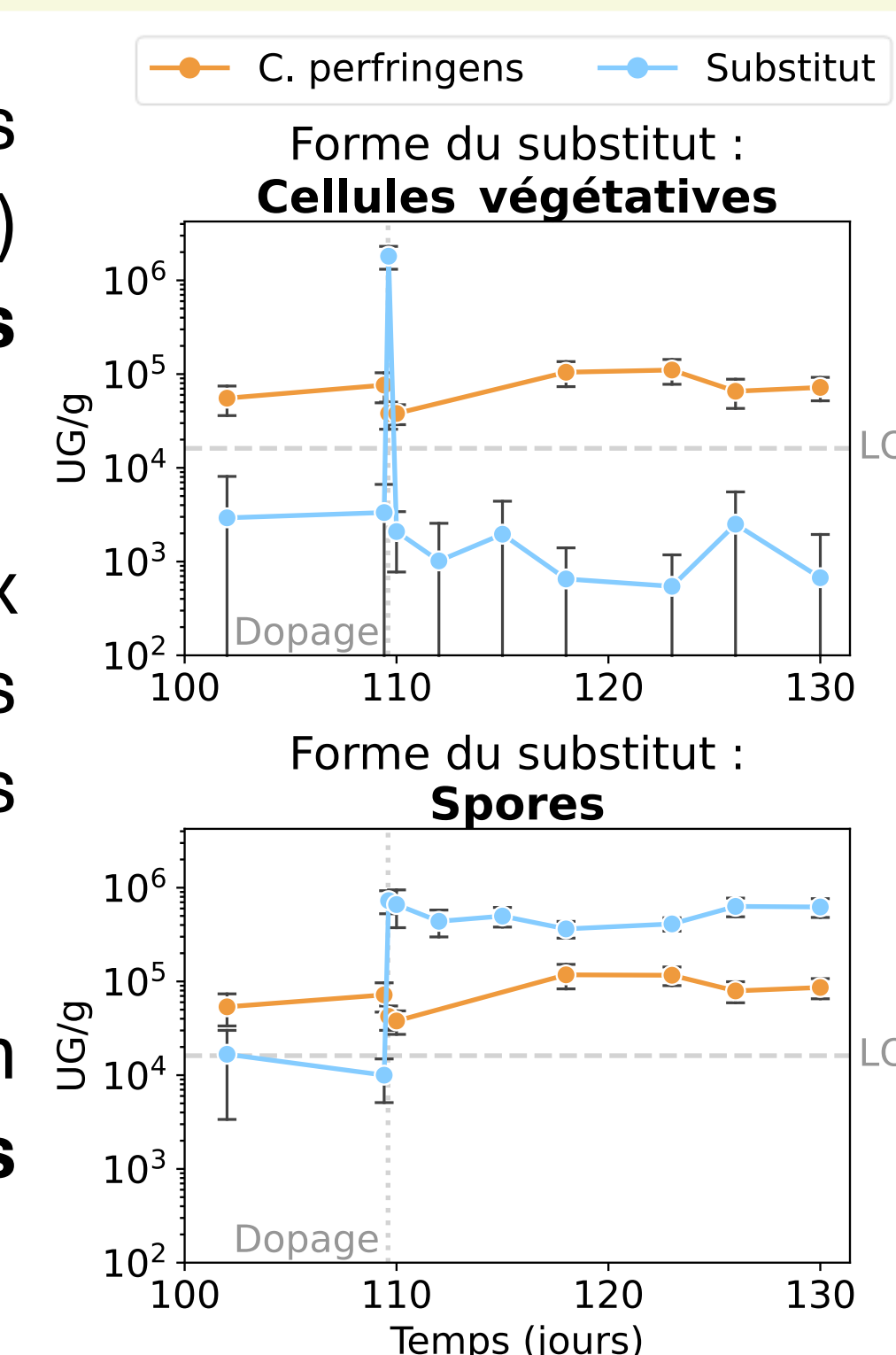


UFC : Unités formant colonies



Dopage du substitut dans des réacteurs continus

- Dopage de 4 réacteurs mésophiles continus (contenant des ***C. perfringens* endogènes**) avec le substitut sous forme de **cellules végétatives** ou sous forme de **spores**
- Suivi des bactéries d'intérêt grâce aux systèmes **qPCR** nouvellement développés (résultats plus rapides et plus précis qu'avec les dénombrements culturaux)
- Les cellules végétatives subissent un abatement immédiat alors que **les spores se maintiennent**



UG : Unités génomiques LQ : Limite de quantification

CONCLUSIONS

- ✓ *C. perfringens* et son substitut subissent des **réductions similaires** dans les conditions testées (batch de méthanisation mésophile, pasteurisation et post-traitement alcalin)
- ✓ Le comportement du **substitut** est plus proche de celui des ***C. perfringens* endogènes** s'il est ajouté sous forme de **spores** que de cellules végétatives

PISTES D'APPROFONDISSEMENT

- ✓ Valider la similarité de comportement des **spores du substitut** et des ***C. perfringens* endogènes** dans d'autres conditions de méthanisation et d'autres pré/post-traitements
- ✓ **Diminuer** les limites de **détection** et de **quantification** des systèmes de détection moléculaire (e.g. en utilisant une méthode de PCR digitale)

PERSPECTIVES INDUSTRIELLES

- ✓ Proposer un service de dopage et de suivi du substitut pour valider la capacité d'un **nouveau procédé de transformation de biodéchets** à réduire la charge en *C. perfringens* en vue de son autorisation par l'autorité compétente [4], **directement sur site industriel** ou dans un laboratoire non-classé L2

[1] : Álvarez-Fraga, L. *et al.* A meta-analysis of pathogen reduction data in anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **207**, 114982 (2025)

[2] : Hu, M. & Gurtler, J. B. Selection of Surrogate Bacteria for Use in Food Safety Challenge Studies: A Review. *Journal of Food Protection* **80**, 1506–1536 (2017)

[3] : EPA MLB SOP MB-28: Procedure for the Production and Storage of Spores of *Clostridium difficile* for Use in the Efficacy Evaluation of Antimicrobial Agents (2017)

[4] : « Méthode de transformation 7 » telle que définie dans le règlement (UE) no 142/2011 de la Commission du 25 février 2011