



Offre de thèse

Impact des paramètres majeurs du procédé de méthanisation à la ferme sur les *Clostridium* et leurs gènes de résistance aux antibiotiques : conséquences sur la dissémination des spores et de l'antibiorésistance

Contexte et problématique

Le procédé de digestion anaérobie (ou méthanisation) transforme la matière organique en biogaz et en un sous-produit de dégradation, appelé digestat, valorisable en agriculture. Fortement soutenue par le ministère du Développement durable et le ministère de l'Agriculture, la méthanisation à la ferme ne cesse de prendre de l'ampleur, produisant des digestats dont la qualité sanitaire peut poser un problème de santé publique. En effet, la digestion anaérobie conduit à un abattement relativement faible des teneurs en bactéries pathogènes (Salsali *et al.*, 2006) et impacte peu ou pas les concentrations en gènes de résistance aux antibiotiques (GRAs) (Wolters *et al.*, 2016). Après épandage, les bactéries résistantes aux antibiotiques issues des produits résiduels organiques sont capables de transmettre leurs gènes de résistance à la flore autochtone du sol par transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles, de persister dans le sol et /ou de diffuser vers les eaux environnementales et de contaminer les végétaux destinés à la consommation humaine ou animale (Berman et Riley, 2013 ; Hsu *et al.*, 2014 ; Marti *et al.*, 2013 ; Micallef *et al.*, 2013). De même, le retour au sol des digestats sur des cultures ou des pâturages peut conduire à une dissémination des agents pathogènes dans l'environnement agricole et contaminer les animaux d'élevages et l'homme (Froeschle *et al.*, 2015). Il est donc essentiel d'assurer la qualité sanitaire des digestats afin de minimiser le risque de dissémination de l'antibiorésistance et des micro-organismes pathogènes lors de l'épandage, sans altérer le rendement énergétique de l'installation.

Parmi les bactéries pathogènes, les espèces du genre *Clostridium* méritent une attention particulière en raison du portage sain de certaines d'entre-elles (à l'exemple de *C. botulinum* et de *C. difficile*) par les bovins et les porcs (Myllykoski *et al.*, 2006 ; Souillard *et al.*, 2015) et de leur capacité à se multiplier dans des conditions anaérobies associées à une température mésophile et à une matrice riche en matière organique, telles que celles retrouvées dans les méthaniseurs. De plus, une étude menée par Leclercq *et al.* (2016) sur la dynamique des bactéries du lisier de porcs et leurs GRAs associés, dans des microcosmes de sol amendés par du lisier, a mis en évidence que l'enrichissement des GRAs dans le sol n'était associé qu'à quelques taxons incluant notamment des espèces de *Clostridium* d'origine entérique, soulignant le rôle majeur joué par des *Clostridium* dans la dissémination de l'antibiorésistance. La compréhension de l'influence des paramètres du procédé de méthanisation sur le développement des *Clostridium* résistants aux antibiotiques afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement représente donc un enjeu important en matière de santé-environnement. Enfin, il est important d'estimer si le prétraitement thermique (70°C/1h) en amont de la méthanisation, imposé par le règlement européen n° 142/2011 contribue à favoriser le développement des *Clostridium* dans le digesteur anaérobie qui représente *a priori* un environnement propice à leur croissance.

Objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse est d'estimer à l'échelle pilote l'impact de deux paramètres importants du procédé de digestion anaérobie (charge organique, temps de séjour hydraulique) et du pré-traitement (70°C, 1h) imposé par le règlement européen n° 142/2011 sur le comportement des *Clostridium* et de leurs GRAs associés. Par ailleurs, afin de prendre en compte la progression sur le territoire français de la digestion anaérobie thermophile, l'effet de la température (digestion anaérobie mésophile vs thermophile) sera également étudié.

Méthodologie

Les *Clostridium* seront quantifiés par méthode culturale et moléculaire (RT-qPCR). Leur antibiorésistance sera caractérisée selon les protocoles préconisés par l'EUCAST. Les GRAs seront quantifiés par qPCR. Les flores bactériennes et archéennes des digestats seront caractérisées par analyse métagénomique (pyroséquençage). L'impact du TSH, de la charge organique et du prétraitement (70°C, 1h) sera étudié sur des pilotes de digestion anaérobie voie liquide semi-continu, maintenus à 38°C et alimentés avec un mélange de lisier et de co-substrat. L'impact de la température (mésophile vs thermophile) sera réalisé en système batch à l'aide de flacons contenant différents lisiers maintenus à 38°C et 55°C.

Profil recherché

- Master Recherche ou équivalent en microbiologie
- Compétences dans les domaines suivants : microbiologie moléculaire, microbiologie culturale, bioinformatique, statistiques.
- Intérêt pour le travail interdisciplinaire (génie des procédés, microbiologie)
- Capacités à concevoir et exécuter des expérimentations
- Bon niveau de communication en anglais (oral et écrit)

Environnement scientifique

La thèse se déroulera sur 3 ans à partir d'octobre/novembre 2017 à Irstea Rennes dans l'Unité de Recherche OPAALE (Optimisation des procédés en Agriculture, Agroalimentaire et Environnement) au sein de l'Équipe SAFIR (Stratégies d'amélioration des filières et de réduction des impacts).

Le sujet de thèse s'intègre dans un projet de recherche plus global, financé par l'ADEME, en partenariat avec l'ANSES de Ploufragan, portant sur l'impact de la digestion anaérobie sur les bactéries pathogènes sporulantes et non sporulantes. Des collaborations sont prévues avec l'unité HQPAP (Hygiène et qualité des produits avicoles et porcins) de l'ANSES de Ploufragan.

Contact / Encadrement

Anne-Marie Pourcher, directeur de recherche, Irstea Rennes, UR OPAALE : anne-marie.pourcher@irstea.fr

Références bibliographiques

- Berman, H.F. *et al.* (2013) Identification of novel antimicrobial resistance genes from microbiota on retail spinach. *Bmc Microbiology* 13.
- Froeschle, B. *et al.* (2015) Hygiene and Sanitation in Biogas Plants. *Biogas Science and Technology Book series: Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology* 151, 63-99.
- Hsu, J.T. *et al.* (2014) Prevalence of sulfonamide-resistant bacteria, resistance genes and integron-associated horizontal gene transfer in natural water bodies and soils adjacent to a swine feedlot in northern Taiwan. *Journal of Hazardous Materials* 277, 34-43.
- Leclercq, S.O. *et al.* (2016) A multiplayer game: species of *Clostridium*, *Acinetobacter*, and *Pseudomonas* are responsible for the persistence of antibiotic resistance genes in manure-treated soils. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.13337
- Marti, R. *et al.* (2013) Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology* 79(18), 5701-5709.
- Micallef, S.A. *et al.* (2013) Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on US Mid-Atlantic farms. *Food Microbiology* 36(2), 465-474.
- Myllykoski, J. *et al.* (2006) The detection and prevalence of *Clostridium botulinum* in pig intestinal samples. *International Journal of Food Microbiology* 110(2), 172-177.
- Salsali, H.R. *et al.* (2006) Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Canadian Journal of Microbiology* 52(4), 279-286.
- Souillard, R. *et al.* (2015) Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Veterinary Microbiology* 180(1-2), 142-145.
- Wolters, B. *et al.* (2016) Full-scale mesophilic biogas plants using manure as C-source: bacterial community shifts along the process cause changes in the abundance of resistance genes and mobile genetic elements. *Fems Microbiology Ecology* 92(2).