

Influence et interaction de différents paramètres sur la survie de *Salmonella enterica* dans du lisier de porc

Corinne ROBINAULT, Marianne CHEMALY, Christelle FABLET, Annie LABBE, Jean-Pierre JOLLY, François MADEC, Philippe FRAVALO

AFSSA site de Ploufragan, Zoopôle, BP 53, 22440 Ploufragan, France

c.robinault@ploufragan.afssa.fr

Influence et interaction de différents paramètres sur la survie de *Salmonella enterica* dans du lisier de porc

La principale source de salmonelles dans la filière porcine est le porc vivant porteur sain. Les salmonelles portées et excrétées par ces animaux peuvent entraîner une contamination du lisier. Ce dernier étant épandu, il représente un risque pour l'environnement. L'objectif de cette étude est de décrire les effets de trois paramètres (temps et température de stockage, concentration initiale en salmonelles) et de leurs interactions sur la survie de *Salmonella enterica* dans le lisier de porc. Deux plans d'expériences ont ainsi été menés avec deux isolats de *Salmonella* Typhimurium. Les trois paramètres ont montré une influence significative. Le temps et la température avaient un effet négatif (plus le paramètre augmente, plus la concentration en salmonelles diminue). La concentration initiale en salmonelles présentait un effet positif. L'interaction entre le temps et la température était significative avec un effet négatif. Deux équations de modélisation ont été obtenues. Des données expérimentales ont ensuite été acquises pour trois sérotypes différents de *Salmonella enterica* (*Salmonella* Typhimurium, Derby, Brandenburg) pour tester les modèles mathématiques. Les résultats estimés par les équations et les résultats expérimentaux ont été semblables pour *Salmonella* Typhimurium uniquement. En conclusion, la combinaison des facteurs influençant la survie de *Salmonella enterica* dans le lisier de porc est une clé importante pour contrôler le risque de dissémination des salmonelles dans l'environnement. D'autres comparaisons entre données expérimentales et théoriques sont à réaliser pour consolider l'approche du modèle mathématique.

Influence and interaction of different parameters on the survival of *Salmonella enterica* in pig slurry

The main origin of *Salmonella* in pig production is living unaffected carrier pigs. Excretion of *Salmonella enterica* by late-fattening pigs may cause the dissemination of this zoonotic agent in the environment during spreading of contaminated slurry. The objective of this study was to describe the influence and interaction of different factors (storage time and temperature, initial *Salmonella* concentration) on the survival of *Salmonella enterica* in pig slurry. Two experimental shell designs were developed using two different isolates of *Salmonella* Typhimurium. The three parameters significantly influenced the decrease in final *Salmonella* concentration. Storage time and temperature had negative effects (the more the parameter increased, the more *Salmonella* concentration decreased). Initial bacterial concentration showed a significant positive effect. Interaction between temperature and time had a negative effect. Two quadratic equations were obtained. Then experimental data using three different pig *Salmonella* serotypes (*Salmonella* Typhimurium, Derby, Brandenburg) were obtained in order to prove the mathematical models. Estimated results obtained using the quadratic equations and experimental results were similar only for *Salmonella* Typhimurium. In conclusion, the combination of the parameters having an influence on *Salmonella* survival in stored pig slurry is an important key to control the risk of *Salmonella* dissemination in the environment. New comparisons between estimated and experimental data must be carried out to consolidate the mathematical model.

INTRODUCTION

Les salmonelles ubiquistes, agents zoonotiques sont responsables de salmonellose. Dans les pays industrialisés, elles constituent la principale cause de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) chez l'homme (BEH 2002). Des produits carnés issus de la filière porcine ont été associés à des cas de TIAC à salmonelles. Il a été estimé que 10 à 15 % des cas de salmonelloses humaines diagnostiquées avaient pour origine la viande de porc (Berends et al., 1998 ; Hald et al., 1999). La principale source de salmonelles dans la filière porcine est le porc vivant porteur sain. Ce portage asymptomatique est à l'origine de la contamination des carcasses à l'abattoir, mais peut également entraîner une contamination de l'environnement. En effet, les salmonelles portées et excrétées par les porcs porteurs sains peuvent contaminer les effluents d'élevage, fumier et lisier. Ainsi l'excrétion de *Salmonella enterica* par des porcs en fin d'engraissement peut entraîner la dissémination de cet agent zoonotique dans l'environnement lors de l'épandage de lisier contaminé (Baloda et al., 2001). Ce dernier étant épandu sur les pâtures, il représente alors un risque de contamination des animaux (ruminants) mais également de pollution par des eaux de ruissellement contaminées voire des zones de loisirs (baignade) (Baudart et al., 2000). De par leurs caractéristiques physiologiques, les salmonelles ubiquistes peuvent survivre dans les effluents et persister plusieurs mois sur et dans les sols (Strauch et al., 1991 ; Côté et al., 2005). Des études ont montré le rôle épurateur du lisier (Placha et al., 2001). Les conditions de la maîtrise de ce rôle dans un contexte de production ne sont pas connues. Une maîtrise du risque lié à l'épandage de cet effluent passe par l'étude des facteurs influençant l'évolution de la population de *Salmonella enterica* dans le lisier en fonction du temps de stockage.

L'objectif de ce projet est de décrire l'influence de paramètres (temps et température de stockage, concentration initiale de salmonelles) et de leurs interactions sur la survie des salmonelles dans le lisier. Une approche méthodologique de type plan d'expériences a ainsi été conduite, pour accéder notamment à ce dernier paramètre, et proposer une modélisation de l'évolution de *Salmonella enterica* dans cet effluent. De nouvelles données expérimentales ont ensuite été acquises pour tester les modèles mathématiques. Il s'agit d'acquérir des données applicables dans les conditions de production dans le but de conforter des mesures préventives vis-à-vis de la dissémination de *Salmonella enterica* depuis un élevage de porc.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Plans d'expériences

Deux isolats de *Salmonella enterica*, de sérotype Typhimurium, d'origine porcine, ont été utilisées. Une *Salmonella* Typhimurium (PF 1690) provenait d'un échantillon traité à l'AFSSA de Ploufragan, et l'autre isolat *Salmonella* Typhimurium (Be) a été fourni par un laboratoire de l'université de Liège (Faculté de Médecine Vétérinaire).

Les inoculations ont été réalisées à partir de culture en bouillon BHI incubé à 37°C pendant 24h. La dose ajoutée au lisier a été vérifiée par numération.

Le lisier utilisé (10L) pour chaque plan d'expériences provenait d'une fosse de stockage d'un atelier d'engraissement de porcs et a été prélevé dans des flacons stériles. Il a été homogénéisé dans un récipient stérile et contrôlé indemne de salmonelles selon la technique de détection utilisée au laboratoire (NFU 47-100).

Deux plans d'expériences basés sur les réseaux uniformes de Doelthert (Doelthert, 1970) ont été réalisés. Trois paramètres ont été étudiés par plan à des niveaux différents. Il s'agissait de la concentration initiale de salmonelles du lisier (3 niveaux : 10^2 , 10^3 , 10^4 UFC/ml), la température de stockage du lisier (5 niveaux : 2, 9, 16, 23, 30°C) et le temps de stockage du lisier (7 niveaux de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 jours). Le nombre d'expériences à réaliser a été défini selon la formule $N=k^2+k+1+n$ (k =nombre de paramètres étudiés, n =nombre de répétitions au centre du modèle) soit 16 expériences par souche et par plan. Cette expérimentation a été choisie dans le but d'étudier les effets et les interactions de différents facteurs sur la survie des salmonelles et d'obtenir un maximum d'informations et de précisions avec un nombre réduit d'expériences.

Des flacons stériles ont été remplis de 200ml de lisier et stockés aux températures définies par les plans. A J0 les flacons ont été ensemencés avec les souches de *Salmonella* aux concentrations prévues par les plans. Les dénombrements ont été réalisés par mini-MSRV (Fravallo et al., 2003), au jour défini par les plans d'expériences. Le nombre caractéristique obtenu en comptabilisant le nombre de puits positifs a été transformé en nombre de *Salmonella*/ml grâce au logiciel MPN calculator (<http://members.ync.net/mcuriale/mpn/>) puis en Log₁₀ de *Salmonella* par ml. Les effets de chaque paramètre testé et les effets de leur interaction sur la décroissance de la quantité de *Salmonella* dans le lisier ont été évalués en utilisant le logiciel Statgraphics® plus version 5.1.

1.2. Données expérimentales

Trois souches de *Salmonella enterica* provenant d'échantillons d'origine porcine traités à l'AFSSA de Ploufragan ont été utilisées : *Salmonella* Typhimurium (PF 4475), *Salmonella* Derby (PF 6696), *Salmonella* Brandenburg (PF 2881). Le lisier utilisé (6L) provenait du même élevage que précédemment et a été contrôlé indemne de salmonelles. Des flacons stériles ont été remplis de 200ml de lisier et pré-incubés à 8°C ou 30°C. A J0 les flacons ont été ensemencés avec 10^3 UFC/ml de *Salmonella* et les incubations ont été conduites à 8°C et 30°C pour chaque souche. La mesure de la concentration résiduelle en *Salmonella* a été effectuée à J0, J3, J6. Les dénombrements ont été réalisés par mini-MSRV. Le nombre caractéristique obtenu en comptabilisant le nombre de puits positifs a été transformé en nombre de *Salmonella*/ml grâce au logiciel MPN calculator (<http://members.ync.net/mcuriale/mpn/>) puis en Log₁₀ de *Salmonella* par mL.

2. RÉSULTATS

2.1. Plans d'expériences

Le tableau 1 représente les effets individuels des paramètres ainsi que les effets de leur interaction dans les plans d'expériences conduits. Concernant les effets des différents facteurs sur la survie des salmonelles, un effet estimé négatif indique que la concentration de salmonelles décroît quand le facteur croît. Inversement si l'effet estimé est positif, plus le facteur sera important, plus la concentration finale de salmonelles sera importante. La prise en compte de ces effets est liée à leur significativité exprimée par la valeur p .

Pour le plan 1, conduit avec la souche PF 1690, la température de stockage ($p=0,020$), le temps de stockage ($p=0,035$) et la concentration initiale de salmonelles ($p=0,005$) montrent une influence significative ($p<0,05$) sur la concentration finale de *Salmonella* Typhimurium. La température et le temps de stockage ont un effet négatif. La concentration initiale de salmonelles présente un effet positif. Seule l'interaction entre le temps et la température ($p=0,013$) apparaît significative avec un effet négatif. Pour le plan 2, la température ($p=0,004$) et la concentration ($p=0,001$) influencent significativement la décroissance de la souche de *Salmonella* Typhimurium Be utilisée. La température de stockage a un effet négatif, tandis que la concentration initiale de salmonelles a un effet positif. L'interaction entre le temps et la température ($p=0,020$) est à nouveau significative avec un effet négatif.

Pour les deux plans une modélisation a été possible. Les équations mathématiques ont été obtenues selon le modèle suivant. Chaque réponse est représentée par un modèle quadratique comprenant 10 coefficients de régression pour les

trois variables testées décrivant les interactions et les relations entre la réponse et les facteurs expérimentaux.

$$C = c + \sum_{i=1}^n E_i X_i + \sum_{i=1}^n E_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n E_{ij} X_i X_j$$

C est la variable dépendante (concentration en salmonelles du lisier) ; c est le coefficient constant (moyenne) ; X_i sont les variables indépendantes ; E_i sont les coefficients linéaires ; E_{ii} sont les coefficients des doubles interactions et E_{ij} sont les coefficients quadratiques.

Les équations d'évolution des souches utilisées sont construites en prenant comme variables indépendantes la température (X_1), le temps (X_2), la concentration (X_3).

Equation 1 : équation de modélisation pour la souche *Salmonella* Typhimurium PF 1690 :

$$C = -7,472 + (0,107 \times X_1) + (0,810 \times X_2) + (5,622 \times X_3) + (-0,003 \times X_1 \times X_1) + (-0,053 \times X_2 \times X_2) + (-0,831 \times X_3 \times X_3) + (-0,033 \times X_1 \times X_2) + (0,015 \times X_1 \times X_3) + (-0,034 \times X_2 \times X_3)$$

Equation 2 : équation de modélisation pour la souche *Salmonella* Typhimurium Be :

$$C = -2,531 + (0,018 \times X_1) + (0,206 \times X_2) + (3,328 \times X_3) + (-0,004 \times X_1 \times X_1) + (-0,021 \times X_2 \times X_2) + (-0,532 \times X_3 \times X_3) + (-0,018 \times X_1 \times X_2) + (0,035 \times X_1 \times X_3) + (0,045 \times X_2 \times X_3)$$

2.2. Données expérimentales

Les mesures expérimentales des différents paramètres à J0 ont été introduites dans les équations de modélisation (1 et 2) obtenues précédemment. Ainsi la concentration à J0 a été testée pour 8°C et 30°C à 3 puis 6 jours pour chaque souche. Les

Tableau 1 - Résultats des plans d'expériences des deux *Salmonella* Typhimurium PF 1690 et Be

	Paramètres ¹	Effets estimés (PF 1690)	p (PF 1690)	Effets estimés (Be)	p (Be)
Paramètres indépendants	c	3,645	-	3,660	-
	X1	- 1,160	0,020 ^c	- 1,370	0,004 ^b
	X2	- 0,818	0,035 ^c	- 0,455	0,053
	X3	1,530	0,005 ^b	1,667	0,001 ^a
Interactions entre les paramètres	X11	- 1,150	0,082	- 1,440	0,016 ^c
	X22	- 0,958	0,064	- 0,375	0,186
	X33	- 1,662	0,010 ^b	- 1,063	0,010 ^b
	X12	- 2,750	0,013 ^c	- 1,530	0,020 ^c
	X13	0,407	0,501	0,980	0,070
	X23	- 0,207	0,690	0,270	0,445

¹c = constante, X1 = température, X2 = Temps, X3 = concentration, Xij = interaction entre les facteurs i et j

^a $P \leq 0,001$; ^b $0,001 < P \leq 0,01$; ^c $0,01 < P < 0,05$

résultats estimés ont ensuite été comparés aux résultats expérimentaux trouvés à J3 et J6. La comparaison entre les données expérimentales et les données estimées est représentée figure 1 pour *Salmonella* Typhimurium, figure 2 pour *Salmonella* Derby, figure 3 pour *Salmonella* Brandenburg.

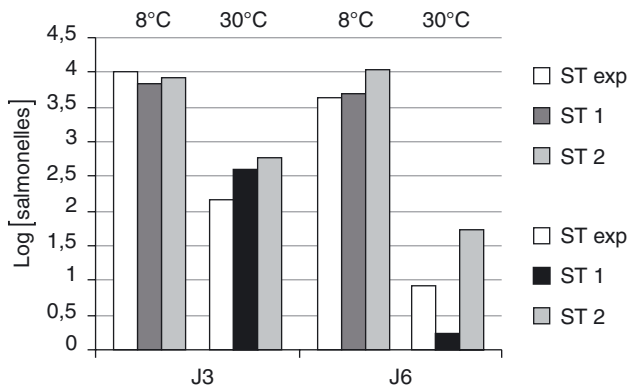


Figure 1 - Comparaison des données expérimentales (ST exp) et théoriques (ST1, ST2) pour *Salmonella* Typhimurium

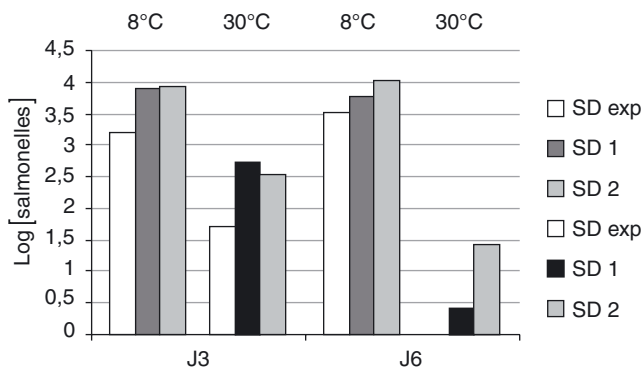


Figure 2 - Comparaison des données expérimentales (SD exp) et théoriques (SD1, SD2) pour *Salmonella* Derby

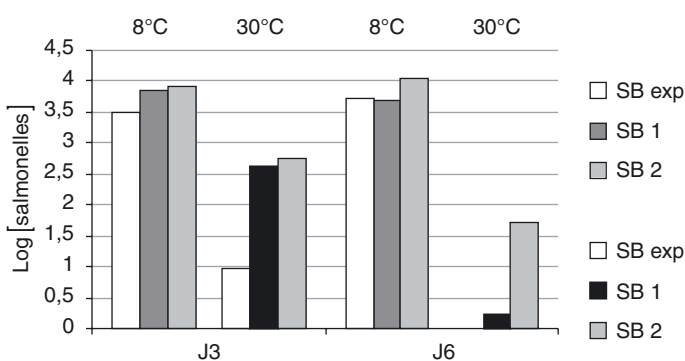


Figure 3 - Comparaison des données expérimentales (SB exp) et théoriques (SB1, SB2) pour *Salmonella* Brandenburg

3. DISCUSSION

L'objectif de ce travail était de décrire l'influence et l'interaction de différents facteurs sur la survie de salmonelles dans le lisier.

L'effet du temps de stockage est significatif pour un plan. Cependant dans le plan où il n'apparaît pas significatif, le p de ce facteur (0,053) est proche du seuil de significativité

(0,05). Différents auteurs ont montré que la concentration en *Salmonella enterica* dans du lisier de porc décroissait pendant le stockage (Munch et al., 1987 ; Ajariyakhajorn et al., 1997 ; Heinonen-Tanski et al., 1998 ; Baloda et al., 2001 ; Watabe et al., 2003 ; Hutchison et al., 2005). Munch et al. (1987) ont trouvé que l'inactivation de cette bactérie pathogène pourrait se caractériser comme une fonction exponentielle du temps. Beaucoup d'auteurs se sont accordés sur le fait que le stockage du lisier est une étape importante dans les traitements pour éliminer les pathogènes. En conclusion, le temps apparaît influencer sérieusement la survie des salmonelles dans le lisier. Jones (1976) a démontré que le nombre de salmonelles dans du lisier de bovins chutait pendant la période de stockage. Il a remarqué, comme Plym Forshell et al. (1993), que la durée de survie des salmonelles dans le lisier de bovins était dépendante de la souche en cause. Strauch (1991) a observé également des différences de survie des salmonelles en fonction de l'espèce animale d'où provenait le lisier.

Les résultats ont montré que la survie des souches utilisées était fortement affectée par la température. L'effet était négatif sur la concentration en salmonelles, c'est à dire que plus la température augmente, plus la concentration en salmonelles diminue dans le lisier. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par différents auteurs (Strauch, 1987 ; Ajariyakhajorn et al., 1997 ; Heinonen-Tanski et al., 1998 ; Placha et al., 2001). Les expériences de Placha et al. (2001) ont montré que la décroissance de *Salmonella* Typhimurium dans la fraction solide d'un lisier de porc était plus rapide en été (36 jours) qu'en hiver/printemps (85 jours). Cette observation a été également rapportée par Ajariyakhajorn et al. (1997) qui a constaté que *Salmonella* Anatum survivait plus longtemps à 4°C (56 jours) qu'à 25°C (14 jours) et 37°C (4 jours). Strauch (1987) et Placha et al., (2001) ont observé une décroissance du pH pendant leurs expériences. Placha et al., (2001) ont démontré une corrélation significative entre la survie de *Salmonella* Typhimurium et le pH pendant l'été. Selon Strauch (1987), la décroissance du pH pendant le stockage est influencé par la flore bactérienne naturelle qui produit des acides gras volatils ayant un effet toxique sur les salmonelles. Dans d'autres études, un accroissement du pH a été observé pendant la décroissance des salmonelles (Heinonen-Tanski et al., 1998). L'évolution du pH n'a pas été étudiée dans ce travail.

La concentration initiale de salmonelles est apparue significative avec un effet positif. Plus la concentration initiale de salmonelles était importante, plus la concentration finale l'était également. Jones (1976), dans des lisiers de bovins, et Strauch (1991), dans différents lisiers, ont rapporté que la survie des salmonelles dans le lisier était influencée, dans une certaine mesure, par le nombre de salmonelles contenu au départ dans le lisier. Cette donnée est essentielle pour définir une recommandation quant à la durée de stockage.

L'originalité de ces plans d'expériences est l'évaluation de l'interaction des différents paramètres sur la survie des salmonelles dans le lisier stocké. L'interaction temps/température a montré un effet négatif significatif. La combinaison de ces deux facteurs est une clé importante pour contrôler le risque de dissémination des salmonelles.

Une équation de modélisation a été obtenue pour les deux plans d'expériences. Ces équations pourraient permettre de connaître le taux de salmonelles dans un lisier au bout d'un temps donné en rentrant les différents paramètres nécessaires, c'est-à-dire la température, le temps et la concentration initiale de salmonelles. Au niveau du terrain ces données pourraient être mesurées aisément. Cependant ces paramètres devront être compris dans les intervalles prédéfinis initialement dans les plans d'expériences concernés à savoir une température du lisier comprise entre 2°C et 30°C, une concentration initiale de salmonelles dans le lisier comprise entre 10^2 et 10^4 UFC/ml et un temps de stockage du lisier compris entre 0 et 6 jours.

Dans un deuxième temps, l'acquisition de nouvelles données expérimentales, incluses dans le domaine expérimental étudié et différentes de celles obtenues dans les plans d'expériences, a permis de tester les modèles mathématiques. Pour les trois sérotypes, les données expérimentales mesurées ont ainsi été comparées aux données théoriques calculées grâce aux équations 1 et 2. En acceptant une différence inférieure à un Log, les résultats estimés se sont révélés similaires aux résultats expérimentaux, quelque soit la température (8°C ou 30°C), pour le sérotype *Salmonella* Typhimurium uniquement.

CONCLUSION

L'influence des trois paramètres temps et température de stockage, concentration initiale de salmonelles apparaît donc importante sur la survie des salmonelles dans le lisier de porc. La connaissance de ces données est essentielle pour l'application de conditions de stockage et de traitement du lisier appropriées avant épandage afin d'éviter tout risque de dissémination de cet agent zoonotique dans l'environnement.

Les modèles mathématiques obtenus fonctionnent pour une autre souche de *Salmonella* Typhimurium dans le domaine expérimental étudié. D'autres comparaisons entre données expérimentales et théoriques sont à réaliser pour consolider l'approche du modèle mathématique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les éleveurs et leurs groupements pour leur coopération ainsi que l'Université de Médecine Vétérinaire de Liège en Belgique qui a fourni gracieusement des souches de salmonelles. Cette étude a été co-financée par l'AFSSE et le programme Porcherie Verte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ajariyakhajorn C., Goyal S. M., Robinson R. A., Johnston L. J., Clanton C. A., 1997. The survival of *Salmonella* Anatum, pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine slurry. *Microbiol.* 20, 365-369.
- Baloda S. B., Christensen L. Trajcevska S., 2001. Persistence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl. Environm. Microbiol.* 67(6), 2859-2862.
- Baudart J., Lemarchand K., Brisabois A., Lebaron P., 2000. Diversity of *Salmonella* strains isolated from aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environm. Microbiol.* 66(4), 1544-52.
- BEH, 2002. Toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. Haeghebaert S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallay A., Espié E., Vaillant V., 50,249-253.
- Berends B.R., 1998. Impact on human health of *Salmonella* on pork in the Netherlands and the anticipated effect on some currently proposed control strategies. A risk assessment approach to the modernization of the meat safety assurance. PhD-Thesis, Print Partners Ipskamp b.v., Enschede, The Netherlands.
- Côté C., Quessy S., 2005. Fate of indicator and pathogenic microorganisms in liquid hog manure and soil. *Proceedings of international workshop on green pork production. Porcherie Verte, Paris, France*, 27-28.
- Doelthert D. H., 1970. Uniform shell design. *Applied statistics* 19, 231-239.
- Fravallo P., Hascoet Y., Le Fellic M., Queguiner S., Petton J., Salvat G., 2003. Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: the mini-MSRV MPN technique. *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.*, 11, 81-88.
- Hald T., Molback K., 1999. Quantitative assessment of the sources of the human salmonellosis attributable to pork. *Proceedings of the third International Symposium, Copenhagen, Denmark*.
- Heinonen-Tanski H., Niskanen E. M., Salmela P., Lanki E., 1998. *Salmonella* in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperatures. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 277-281.
- Hutchison M. L., Walters L. D., Moore A., Avery S. M., 2005. Declines of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *J. Appl. Microbiol.*, 1-8.
- Jones P. W., 1976. The effect of temperature, solids content and pH on the survival of *Salmonellas* in cattle slurry. *Brit. Vet. J.*, 132-284.
- Munch B., Larsen, E. H., Aalbaek B., 1987. Experimental studies on the survival of pathogenic and indicator bacteria in aerated and non-aerated cattle and pig slurry. *Biological Wastes*, 22, 49-65.
- Placha I., Venglovsky J., Sasakova N., Svoboda I. F., 2001. The effect of summer and winter seasons on the survival of *Salmonella* Typhimurium and indicator micro-organisms during the storage of liquid fraction of pig slurry. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 1036-1043.
- Plym Forshell L., Ekesbo I., 1993. Survival of *Salmonellas* in composted and not composted solid animal manures. *J. Vet. Med.*, B 40, 654-658.
- Strauch D., 1987. Hygiene of animal waste management. *Animal production and environmental health*. in: D. Strauch. Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 155-202.
- Strauch D., 1991. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Epizooties.*, 10(3), 813-846.
- Watabe M., Rao J. R., Stewart T. A., Xu J., Millar B. C., Xiao L., Lowery C. J., Dooley J. S. G., Moore J. E., 2003. Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated und unseparated stored pig slurry. *Appl. Microbiol.*, 36(4), 208-212.