

Suivi de la communauté microbienne d'un lisier de porc le long d'une filière d'élevage, approches moléculaire et culturale

Patrick DABERT (1), Hubert BRUGÈRE (2), Pascal PEU (3), Monique KÉROURÉDAN (2), Anne-Marie POURCHER (4), Jean-Philippe DELGÈNES (1) et Jean-Jacques GODON (1).

(1) INRA, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Av. des Etangs, 11100 Narbonne

(2) UMR INRA/ENVT 1225 Interactions Hôtes - Agents pathogènes - Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex

(3) UR GERE - Cemagref, 17 Avenue de Cucillé, 35044 Rennes cedex

(4) Université d'Angers, UFR Sciences, 2, boulevard Lavoisier, 49045 Angers cedex 01

avec la collaboration technique de G. MEYNAUD (ASAMIP, allée des peupliers, BP56, 31322 Castanet Tolosan cedex)

Suivi de la communauté microbienne d'un lisier de porc le long d'une filière d'élevage, approches moléculaire et culturale

L'évolution de la communauté microbienne d'un lisier a été suivie dans un élevage de porcs équipé d'un système de flushage pendant une période de 6 mois. Des prélèvements ont été réalisés sur toute la filière de gestion des déjections : préfosse des bâtiments, fosse de stockage homogénéisée, entrée et sorties de vis compacteuse, lagune de stockage, et enfin sol avant et après épandage du lisier issu du lagunage. La communauté microbienne a été caractérisée et suivie par deux méthodologies différentes. La première utilisant les techniques de microbiologie moléculaire permet d'identifier et de suivre les micro-organismes dominants du lisier sans avoir à les cultiver (bactéries totales, *Clostridium - Eubacterium*, *Bacteroides - Prevotella*, et *Lactobacillus-Streptococcus*). La seconde, utilisant les techniques culturales, a été utilisée pour suivre les bactéries indicatrices, généralement sous-dominantes telles que les entérobactéries, entérocoques, coliformes, *Escherichia coli*, et des bactéries potentiellement pathogènes telles que les Salmonelles, *Listeria monocytogenes*, et *Staphylococcus aureus*. Les deux approches montrent une stabilité dans le temps des populations microbiennes rencontrées sur chaque étape de la filière prise séparément. En revanche, des changements de populations microbiennes et de numération sont observés lorsque le lisier passe d'une étape de la filière à une autre (ex. passage fosse - lagune). Enfin, les micro-organismes présents dans les effluents avant épandage ne sont plus détectables dans le sol après épandage, quelle que soit l'approche utilisée (moléculaire ou culturale).

Monitoring of the microbial community evolution of a swine manure along a piggery faeces management process using molecular and cultural tools.

The microbial community evolution of a swine manure was monitored within a piggery equipped with a flushing system for a period of 6 months. Samples were withdrawn over all the manure management process : breeding house pits, homogenised storage pit, inlet and outlet of the compressor screw, storage lagoon, and finally soil before and after spreading of the manure from the lagoon. The microbial community was characterised and monitored using two different methodologies. The first one used techniques from molecular microbiology which allow the dominant microorganisms from manure to be identified and monitored without a need for culture (total bacteria, *Archaea*, *Clostridiaceae*, *Bacteroides - Prevotella*, and *Lactobacillus-Streptococcus*). The second, based on cultural techniques, was used to enumerate indicative bacteria, usually subdominant, as enterobacteria, enterococcus, coliforms, *Escherichia coli*, and potentially pathogenic bacteria as *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. Both approaches revealed a stability of the microbial populations during time within each step of the manure management process separately. However, qualitative and quantitative microbial population changes were observed when manure was shifting from one step of the process to another one (ex. going from the storage pit to the lagoon). Finally, microorganisms present within the effluent before spreading in the fields were not detectable anymore within soil after the spreading, whatever the technique used (molecular or cultural).

INTRODUCTION

La restructuration des élevages porcins en systèmes hors sol a conduit à la production d'un effluent particulier, le lisier. Actuellement, la production d'un porc charcutier génère en moyenne une tonne de lisier, composé majoritairement des urines et fèces des animaux, mais aussi des eaux de lavage des locaux, des désinfectants et des débris alimentaires. Ce lisier est en général épandu sur les terres agricoles. L'augmentation du cheptel et la concentration des élevages dans des régions fortement spécialisées ont créé des nuisances relatives au stockage du lisier (problèmes d'odeurs, HARTUNG et PHILLIPS, 1994) et au manque de surfaces d'épandage (pollution des nappes phréatiques, MARTINEZ et LE BOZEC, 2000).

Malgré l'importance numérique des micro-organismes présents dans le lisier (10^{10} bactéries par mL) et leur rôle dans la dégradation de la matière organique, la génération des odeurs et les risques sanitaires encourus (LAFERRIERE, 1996 ; GANIERE et al, 2001), peu d'études ont été effectuées sur la flore globale du lisier. Les études se sont surtout focalisées sur les flores intestinales et sur la persistance des bactéries fécales pathogènes (généralement les Salmonelles) au cours du stockage et après épandage (RIVIERE et al, 1974 ; EDE et CA de Bretagne, 1998). Ces études, d'abord réalisées à l'aide de méthodes culturales, ont souligné l'importance des micro-organismes Gram + anaérobies strictes ou facultatifs (essentiellement *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* et *Clostridium*) ainsi que des bacilles Gram - du genre *Bacteroides* (SALINITRO et al, 1978 ; SPOELSTRA, 1978 ; RUSSEL, 1979 ; IANNOTI et al, 1982).

L'avènement des techniques de microbiologie moléculaire, qui permettent l'identification et le suivi des micro-organismes sans culture préalable, a révolutionné la vision que nous avons de nombreux écosystèmes (AMANN et al., 1995 ; DABERT et al, 2002a). Appliquées à la flore fécale porcine et au lisier, ces techniques ont globalement confirmé la présence des grands groupes microbiens observés par les techniques culturales. Elles ont toutefois souligné l'extrême diversité de ces écosystèmes et notamment la part importante de micro-organismes encore inconnus (PRYDE et al, 1999 ; WHITEHEAD et COTTA, 2001 ; LESER et al, 2002 ; DABERT et al, 2002b). Ainsi, l'inventaire de la flore fécale de 24 porcs Large White a révélé la présence de 375 phylotypes (« espèces moléculaires ») différents dont seulement 17 % étaient proches d'espèces déjà connues (LESER et al, 2002). Le même constat a été effectué sur deux études de lisier de porc où 34 et 56 % des phylotypes observés étaient proches d'espèces déjà connues avec seulement 12 % d'entre eux proches d'espèces cultivées (WHITEHEAD et COTTA, 2001 ; DABERT et al, 2002b). De plus, seulement 35 % des phylotypes retrouvés dans le lisier correspondaient à des phylotypes de la flore fécale porcine (DABERT et al, 2002b).

Les travaux présentés ici ont pour objectif le suivi de l'évolution de la communauté microbienne du lisier de porc tout au long d'une filière d'élevage, depuis les fèces jusqu'à l'épandage. Deux approches sont utilisées : i) le développement

d'outils moléculaires permettant de suivre les populations microbiennes dominantes du lisier sans *a priori* ; ii) une approche de microbiologie culturale qui permet l'énumération de micro-organismes indicateurs de contamination fécale ou pathogènes sous-dominants.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Exploitation agricole suivie

L'exploitation agricole choisie est un élevage de type naisseur-engraisseur de 220 truies Large White. Elle produit 4 500 porcs et génère environ 4 500 m³ de lisier par an. Les porcs sont élevés dans des bâtiments sur caillebotis intégral. Les fèces et les urines s'écoulent dans des préfosse situées en dessous de l'animal. Le lisier chemine par gravité vers une fosse de stockage couverte et homogénéisée d'une capacité de 800 m³. Un système de *Flushage* permet une recirculation du lisier entre la fosse de stockage et le bâtiment tous les 15 jours environ. Chaque semaine une partie du lisier stocké est tamisée à l'aide d'une vis compacteuse. La fraction solide est stockée dans un bâtiment en attente d'épandage. La fraction liquide est stockée dans une lagune à ciel ouvert en attendant d'être épandue sur les terres agricoles.

1.2. Prélèvements

Les matières fécales ont été directement échantillonnées sur les caillebotis, le lisier de la fosse a été prélevé grâce à une canne de prélèvement directement dans la fosse après homogénéisation pendant une heure. La lagune a été échantillonnée lors de sa vidange avant l'épandage. Le sol a été prélevé avec une tarière avant et après l'épandage, seul les quinze premiers centimètres ont été échantillonnés en cinq points différents et mélangés. Les prélèvements ont été traités au laboratoire dans un délai de 12h.

1.3. Suivi moléculaire de la communauté microbienne du lisier par PCR-SSCP

1.3.1. Méthodologie

Les techniques d'identification et de suivi moléculaire des micro-organismes sont basées sur la détection du gène codant pour les ARN ribosomiques. Pour l'analyse SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) des communautés microbiennes, les micro-organismes présents dans chaque prélèvement sont lysés et leurs chromosomes (ADN totaux) sont purifiés (figure 1, partie gauche). Les gènes codants pour les ARNr 16S sont partiellement amplifiés *in vitro* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces marquées. Il en résulte un mélange de fragments d'ADNr 16S représentatif des micro-organismes présents dans le prélèvement de départ. Ce mélange est analysé par électrophorèse SSCP qui permet la séparation de fragments d'ADN de même taille mais de séquence différente (ZUMSTEIN et al, 2000 ; DELBES et al, 2000). La communauté microbienne du prélèvement de départ apparaît alors comme un profil de pics où chaque pic correspond à une espèce microbienne différente. La comparaison des profils permet alors de suivre rapidement l'évolution des popula-

tions microbiennes dominantes de l'écosystème. L'identification des pics dominants s'effectue par amplification et clonage des ADNr à l'aide d'amorces non marquées (figure 1, partie droite). Les clones correspondant aux pics dominants du profil total sont triés par PCR-SSCP. Leurs inserts sont identifiés par séquençage et analyse phylogénétique (DELBES et al, 2000).

1.3.2. Extraction d'ADN

Pour les échantillons liquides, 10 ml sont prélevés et centrifugés 10 min à 7 000 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris avec 4 mL de guanidine thiocyanate 4 M Tris-Cl 0,1 M pH 7,5 + 600 µL de N-lauryl sarcosine 10 % afin d'inactiver les activités enzymatiques. Pour les échantillons solides, 10 g sont prélevés et broyés dans un mortier en présence de 8 ml de guanidine thiocyanate 4 M Tris-Cl 0,1 M pH 7,5 et de 1,6 mL de N-lauryl sarcosine 10 %. Les échantillons de sols sont tamisés avant traitement avec un tamis carré de 5 mm de maille. Après homogénéisation, les mélanges sont aliquotés par 0,5 mL et congelés à -20°C. L'extraction de l'ADN total a été effectuée selon la technique de GODON et al (1997).

1.3.3. Analyse PCR-SSCP des communautés microbiennes du lisier

Pour l'analyse de la communauté bactérienne totale du lisier, la région variable V3 des ADNr 16S microbiens a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces Eubactéries selon DELBES et al (2000 ; 2001). Pour le suivi des populations microbiennes des groupes phylogénétiques plus précis, un protocole en

deux étapes de PCR a été mis au point à l'aide d'une nouvelle polymérase très spécifique, l'AccuPrime Taq (Invitrogen). Dans une première étape, un fragment d'ADNr 16S encadrant la région V3 des groupes bactériens d'intérêt est amplifié par l'AccuPrime Taq polymérase à l'aide d'une amorce spécifique (W108, W109 ou W112) couplée à une amorce universelle (W18, GODON et al, 1997). L'amorce W108 (ATTYCACCGCTACACATG) cible 60 % des séquences appartenant aux *Bacillus-Streptococcus-Lactobacillus* (HEILIG et al, 2002), l'amorce W109 (TTACTGGGTGTAAAGGG) cible 80 % des *Eubacterium* et *Clostridium* et relatifs (WOOD et al, 1998), l'amorce W112 (TCACCGTTGCCGGCGTACTC) cible 85 % des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (VAN DYKE et MC CARTHY, 2002). Les réactions de PCR ont été mises au point selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Les températures d'hybridation des amorces sont 52°C pour W108, 50°C pour W109 et 61 °C pour W112. Les produits de cette première PCR sont ensuite dilués 100 fois. Un µl de ces produits de PCR dilués est utilisé comme matrice pour une seconde PCR effectuée à l'aide des amorces Eubactéries dans les conditions décrites précédemment. A toutes les étapes, les produits de PCR sont visualisés et quantifiés sur gel d'agarose à 2 %. L'analyse des produits de PCR par électrophorèse SSCP sur séquenceur automatique à capillaire (ABI 310, Genetic Analyseur, Applied Biosystems), ainsi que l'identification des pics par clonage, tri des clones par SSCP et séquençage des clones d'intérêt ont été décrites par DELBES et al (2000).

1.4. Suivi des marqueurs classiques de contamination fécale et de bactéries potentiellement pathogènes par technique culturale.

Les numérations sont effectuées à partir de 25 g de prélèvements solides ou de 500 ml de prélèvements liquides centrifugés à 8 000 trs/mn pendant 12 mn pour obtenir 25 ml de culot. Les échantillons sont homogénéisés dans un sac stomacher à filtre avec 225 ml de diluant tryptone-sel pendant 10 mn. Les bactéries indicatrices (entérobactéries, entérocoques, coliformes, *Escherichia coli*) et *Staphylococcus aureus* ont été dénombrées par techniques culturales à partir de cette dilution, selon les protocoles AFNOR. Les nombres les plus probables de *Salmonelles* et *Listeria monocytogenes* ont été déterminés après enrichissement en milieu sélectif de 3 dilutions successives et isolement sur gélose sélective. Les numérations ont été rapportées en gramme de matière sèche, déterminée par séchage au four à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

2. RÉSULTATS

Le suivi global de l'élevage comprend au total 54 prélèvements effectués à différents niveaux de la filière de gestion des déjections sur une période allant de décembre 2002 à juin 2003. Pour chaque prélèvement, une évaluation des populations microbiennes dominantes du lisier est effectuée par PCR-SSCP tandis que les indicateurs classiques de contamination fécale et les germes pathogènes sont dénombrés par technique culturale. Seulement une partie des résultats sera présentée ici.

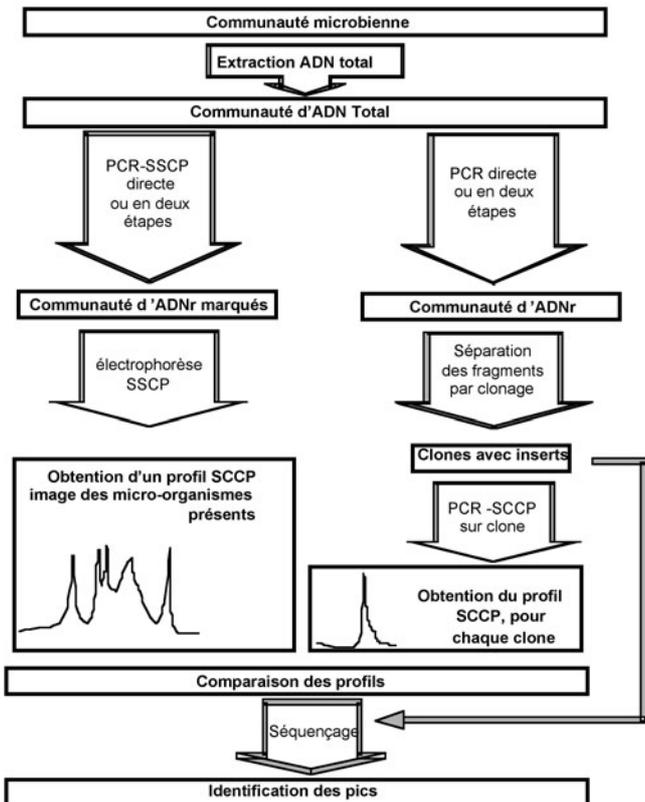


Figure 1 - Suivi des communautés microbiennes par PCR-SSCP et caractérisation des pics observés.

2.1. Analyse de la communauté microbienne du lisier par SSCP

2.1.1. Suivi de la communauté Eubactéries

Les amorces ciblant le domaine des Eubactéries permettent de détecter tous les grands groupes bactériens sauf le domaine des Archées. Un alignement des profils SSCP obtenus à l'aide de ces amorces pour 7 échantillons de la filière est présenté sur la figure 2. Sur chaque profil, un pic représente une espèce bactérienne et la hauteur du pic représente sa proportion relative dans l'écosystème. Les profils ont été alignés et les pics migrant à la même position correspondent à la même espèce.

A première vue, les deux résultats marquants sont : i) les profils observés sont tous très complexes avec une forme plus ou moins « patateïde » et peu de pics dominants bien individualisés. Ce phénomène est caractéristique des écosystèmes présentant une grande diversité. Le profil extrême correspondant à celui du sol où la communauté bactérienne est distribuée sur tout le profil sans pic majoritaire décelable, ii) les profils évoluent surtout lorsque la communauté microbienne passe d'une étape de la filière de gestion des déjections à l'autre. En effet le profil SSCP du lisier dans la fosse se différencie de celui des fèces par son allure générale et par un

nombre plus important de pics individualisés. Une fois dans la fosse de stockage, le profil évolue peu dans le temps et seuls trois nouveaux pics apparaissent nettement sur le profil du 24 mars 03 (flèche rayée, figure 2). La lagune présente un 3^{ème} type de profil où la diversité apparente est réduite (pics dominants notés par des flèches foncées, figure 2). Enfin, aucun des pics présents dans le profil de la lagune (utilisée pour l'épandage) n'est retrouvé dans le profil de la communauté bactérienne du sol après épandage.

Plus en détail, on notera que parmi les 28 pics individualisés présents dans le lisier de la fosse de stockage le 16/12/2002 (E1 à E28, flèches blanches figure 2), 7 pics (E2, E3, E6, E10, E16, E20 et E28) co-migrent avec des pics du profil des fèces. Le pic E6 domine largement les autres reflétant une forte concentration de la population microbienne correspondante dans le lisier. Ce pic était déjà visible sur le profil des fèces et perdure jusque dans la lagune. De même les deux pics qui apparaissent nettement sur la droite du profil de la lagune co-migrent avec les pics E26 et E27 du lisier.

2.1.2. Suivi des groupes microbiens majoritaires du lisier

La grande diversité bactérienne observée dans les profils Eubactéries rend l'interprétation des profils et l'identification des pics difficiles. Un découpage du profil bactérien total a été réalisé en utilisant non plus des amorces " bactéries " générales

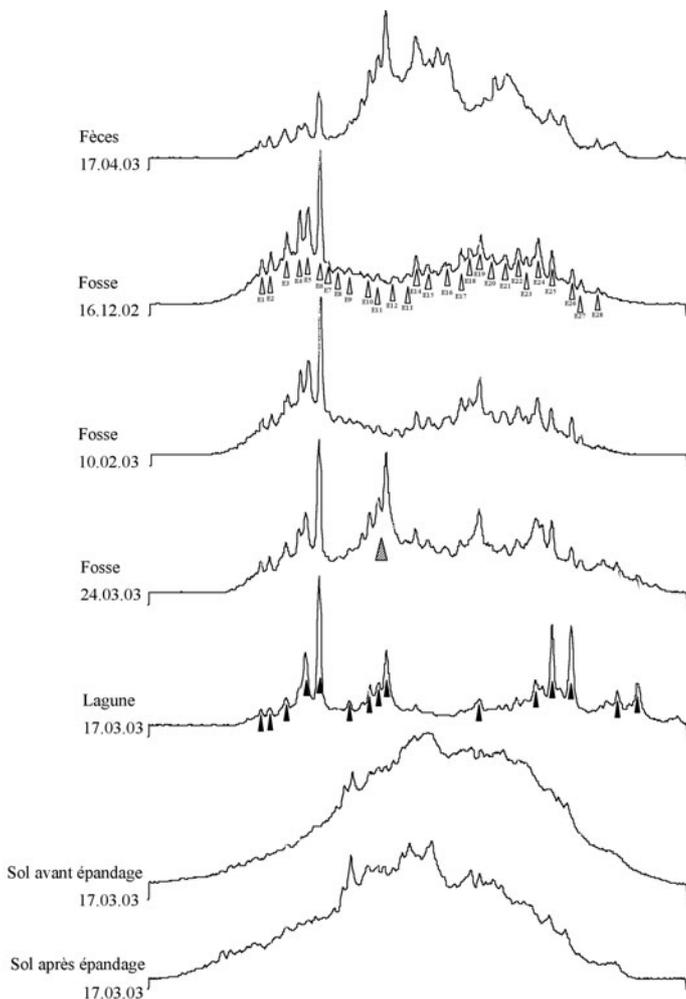


Figure 2 - Suivi de la communauté des Eubactéries du lisier le long de la filière d'élevage par PCR-SSCP.

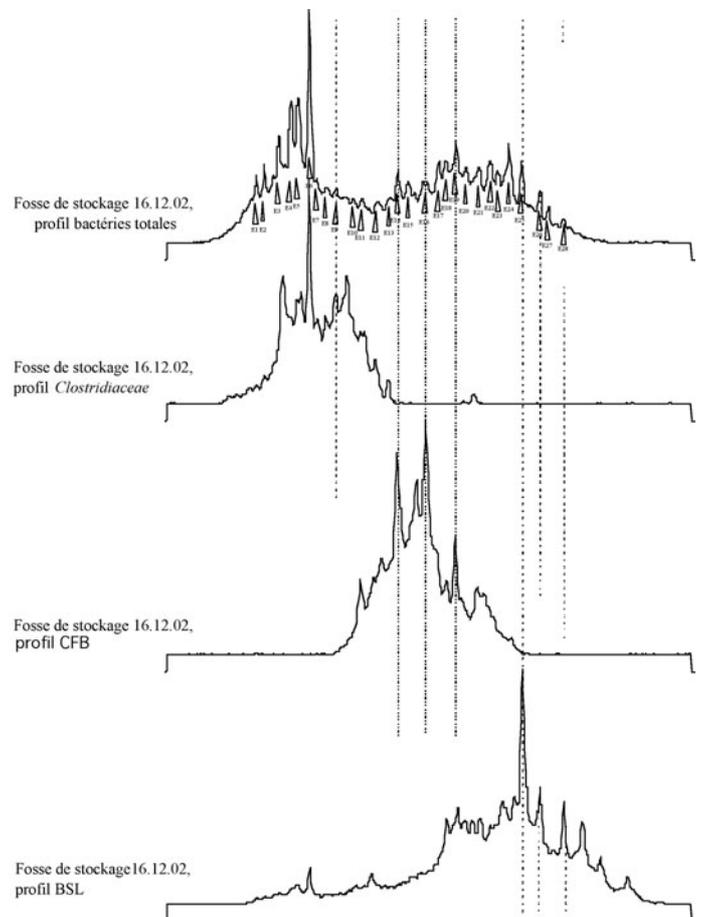


Figure 3 - Inter-comparaison des profils lisier Eubactérie et groupes spécifiques

mais des amorces ciblant les groupes bactériens majoritaires du lisier : *Eubacterium* et *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bacillus* - *Streptococcus* - *Lactobacillus* (BSL), et *Cytophaga* - *Flexibacter* - *Bacteroides* (CFB). Ces groupes et leurs amorces ont été choisis par comparaison des séquences de lisier obtenues au laboratoire et des séquences d'inventaires microbiens réalisés sur les fèces et lisiers de porcs (LESER et al, 2002). La figure 3 montre les profils obtenus sur un même échantillon de lisier après PCR-SSCP avec les amorces Eubactéries (bactéries totales) et les amorces de groupe. L'alignement des profils met en évidence une mobilité électrophorétique bien individualisée pour chacun des groupes. Le profil *Clostridiaceae* se situant avant celui des CFB lui-même précédant le groupe BSL. L'utilisation des amorces de groupes majoritaires permet la visualisation claire des pics dominants de chacun de ces groupes même si leur diversité apparente reste importante. Il est intéressant de constater que plusieurs des pics dominants des profils de groupes co-migrent avec des pics nettement visibles sur le profil des bactéries totales. Tous ces pics, sauf deux (E14 et E28), ont été identifiés comme proches de micro-organismes déjà détectés dans la flore fécale ou le lisier de porc (tableau 1). Un seul des pics (E28) s'est révélé avoir pour plus proche voisin un micro-organisme cultivé.

Le suivi des groupes microbiens majoritaires sur la filière de déjection a globalement confirmé les résultats observés avec les amorces Eubactéries (résultats non montrés) : les changements qualitatifs de populations microbiennes s'observent surtout au passage des fèces aux préfosses du bâtiment, voir au passage de la fosse de stockage à la lagune. Dans tous les groupes, des micro-organismes dominants des fèces persistent jusque dans la lagune, mais aucun d'entre eux n'est détectable dans le sol après épandage. Ces micro-organismes ont été identifiés comme : *Clostridium butyricum* (AY147280) pour les *clostridiaceae*, *Prevotella* sp. (AY005062) pour les CFB et *Streptococcus* (AF445231) pour le groupe BSL.

2.2. Suivi des micro-organismes indicateurs et de bactéries potentiellement pathogènes par les techniques culturales.

Pour chaque prélèvement, la recherche des bactéries indicatrices (entérobactéries, entérocoques, coliformes, *Escherichia coli*), et des Salmonelles, de *Listeria monocytogenes* et de

Staphylococcus aureus a été effectuée par technique culturale. Les numérations, normalisées en colonies formant unité (cfu) par gramme de matière sèche (MS) ou en nombre le plus probable (npp), sont résumées dans le tableau 2. Les données ont montré une stabilité des numérations dans le temps avec par exemple pour la fosse de stockage et les entérobactéries une moyenne de $1,4 \cdot 10^7$ cfu/g de MS et un écart type de $2,5 \cdot 10^7$ sur neuf prélèvements effectués régulièrement de décembre 2002 à juin 2003. De même, les numérations varient peu entre les préfosses, la fosse de stockage et la lagune. Les changements s'opèrent surtout lors du passage des fèces au lisier où les numérations des groupes entérobactéries et coliformes totaux diminuent légèrement dans le lisier alors que celles des autres groupes augmentent légèrement (tableau 2). Au niveau du sol, l'épandage ne semble pas changer significativement les numérations des groupes étudiés. Les limites de détection sont atteintes pour *Escherichia coli*, les Salmonelles et *Listeria monocytogenes*.

3. DISCUSSION

La communauté microbienne d'un lisier a été suivie le long d'une filière d'élevage par deux approches complémentaires. L'approche moléculaire permet la mise en évidence de micro-organismes dominants non cultivables, originaires de la flore fécale porcine, qui persistent au travers de la filière de traitement des déjections. Cette approche est intéressante car elle permet la recherche d'indicateurs de contamination sans avoir d'a priori sur leur identité. Elle reste toutefois limitée de par le fait qu'elle n'est pas quantitative et qu'elle n'est probablement pas encore assez sensible pour permettre la détection de micro-organismes sous dominants. L'utilisation des amorces de groupe permettra peut être dans le futur d'abaisser le seuil de détection de ces techniques. L'approche culturale, plus classique, permet d'accéder aux groupes sous-dominants et à une numération des bactéries indicatrices. Concernant l'évolution de la communauté microbienne du lisier, les deux approches semblent donner le même résultat : les variations qualitatives et quantitatives observées au niveau de la communauté microbienne des déjections sont plus importantes lors des passages d'une étape du traitement à une autre qu'elles ne le sont dans le temps sur une même étape. Cette observation s'explique par le fait que les communautés microbiennes sont fortement

Tableau 1 - Identification des pics communs au profil des Eubactéries et aux profils de groupe

Pics du profil Eubactéries	Séquence la plus proche		
	Identification	% d'homologie	Origine
E6	<i>Clostridium butyricum</i> AY147280	99	Lisier
E8	<i>Clostridium viride</i> AF371793	95	Tube digestif de porc
E9	<i>Clostridium viride</i> AF371786	98	Tube digestif de porc
E14	<i>Prevotella</i> sp. AY005062	98	Cavité buccale humaine
E16	<i>Bacteroidales</i> AF371910	98	Tube digestif de porc
E19	<i>Bacteroidales</i> AF371910	96	Tube digestif de porc
E25	<i>Streptococcus</i> AF445231	100	Lisier
E26	Non identifié	N.D.	N.D.
E28	<i>Lactobacillus iners</i> Y16329	95	Source humaine

Tableau 2 - Suivi des micro-organismes indicateurs et de bactéries pathogènes par les techniques culturales en cfu/g (ou *npp/g) de matière sèche.

Prélèvements (nombre ; dates m/a)	Entérobactéries	Coliformes totaux	<i>E. coli</i>	* Salmonelles	* <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Entérocoques
Fèces	(0,2 à 8,9)	(0,1 à 7,2)	(0,04 à 6,2)	< 20	(2,1 à 2,3)10 ¹	(2,3 à 5,5)	(0,04 à 1,2)
(2 ; 05/03 et 06/03)	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸			10 ⁵	10 ⁶
Préfosse	(0,2 à 3,2)	(0,2 à 2,1)	(0,1 à 2)	< 20 à	0,05 à 1	(0,1 à 1)	(0,02 à 1,6)
(4 ; 11/02 à 06/03)	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	1,5 10 ²	104	10 ⁷	10 ⁷
Fosse	(0,1 à 8)	(0,05 à 6,5)	(0,05 à 6,4)	< 20 à	8,8 10 ¹ à	(0,2 à 9,2)	(0,01 à 2,8)
(9 ; 11/02 à 06/03)	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	2,2 10 ²	3,8 10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸
Lagune	(1,9 à 8,8)	(0,02 à 7,5)	(0,05 à 7,5)	< 20 à	< 20 à	(1,8 à 3,8)	(0,1 à 3,3)
(5 ; 11/02 à 06/03)	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	2,9 10 ²	2,2 10 ²	10 ⁶	10 ⁷
Sol avant épandage	(2,2 à 3)	ND à	ND à	< 6	< 6	(0,06 à 1,7)	ND à
(2 ; 02/03 et 03/03)	10 ³	1,2 10 ²	12			10 ⁵	2,3 10 ²
Liquide épandu	2,7 10 ⁵	2,7 10 ⁵	2,7 10 ⁵	4,5 10 ¹	< 20	9 10 ⁵	1,9 10 ⁶
Sol après épandage							
Jour 0 (17/03/03)	7,2 10 ³	11	11	< 6	< 6	1,5 10 ⁵	5,7 10 ²
Jour + 3	7,1 10 ³	11	11	< 6	< 6	1,4 10 ⁵	4,9 10 ²
Jour + 7	9,7 10 ³	22	ND	< 7	< 6	5,7 10 ⁵	9,9 10 ²
Jour +15	5,2 10 ⁴	1,9 10 ²	71	< 6	< 6	1,8 10 ⁶	ND
Jour +28	1,1 10 ⁴	7,2 10 ²	ND	< 6	6,8 10 ¹	2,8 10 ⁵	3 10 ²
Jour +49	5,8 10 ⁴	19	ND	< 6	< 6	9,7 10 ⁴	4,3 10 ²
Jour +77	4,8 10 ³	57	< 10	< 6	< 6	3,2 10 ⁴	ND

influencées par les paramètres physico-chimiques de leur environnement. L'absence d'abattement clair du nombre d'indicateurs fécaux observée dans cette expérience semble en désaccord avec les travaux effectués précédemment (RIVIERE et al., 1974). Cette différence est probablement liée au fait que les travaux antérieurs ont été effectués dans des systèmes clos alors que les systèmes réels sont alimentés en

fèces en continu. Cette observation demande à être vérifiée par de plus amples expériences, notre étude ne portant à l'heure actuelle que sur le suivi d'un seul élevage.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le GIS Porcherie Verte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMANN R.I., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H., 1995. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.
- DABERT P., DELGENES J.P., MOLETTA R., GODON J.J., 2002a. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*, 1, 39-49.
- DABERT P., SNELL CASTRO R., GODON J.J., 2002b. Rapport d'étape 2001 du programme Porcherie Verte. Dynamique des écosystèmes microbiens et survie des pathogènes dans les effluents d'élevage.
- DELBES C., MOLETTA R., GODON J.J., 2000. *Environmental Microbiology* 5, 506-515.
- DELBES C., MOLETTA R., GODON J.J., 2001. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 19-26.
- EDE et CA de Bretagne, 1998. Utilisation du lisier de porc sur les pâtures et risques de contamination des bovins par les salmonelles.
- GANIERE J.P., RUVOEN N., ANDRE - FONTAINE G., 2001. *Med Mal Infect* 31(Suppl.2), 143-158.
- GODON J.J., ZUMSTEIN E., DABERT P., HABOUZIT F., MOLETTA R., 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (7), 2802-2813.
- HARTUNG J., PHILLIPS V.R., 1994. *J. Agric. Res.*, 57, 173-189.
- HEILIG H.G., ZOETENDAL E.G., VAUGHAN E.E., MARTEAU P., AKKERMANS A.D., DE VOS W., 2002. *Appl Environ Microbiol.*, 68(1), 114-123.
- IANNOTI E.L., FISCHER J.R., SIEVERS D.M., 1982. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 43 (1), 136-143.
- LAFERRIERE M. 1996 *Vecteur Environnement* 29 (3), 27-31.
- LESER T.D., AMENUVOR J.Z., JENSEN T.K., LINDECORONA R. H., BOYE M., MOLLER K., 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2), 673-690.
- MARTINEZ J., LE BOZEC G., 2000. *Cahiers Agricultures*, 9, 181-190.
- PRYDE S. E., RICHARDSON J., STEWART C. S., FLINT H. J., 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (12), 5372-5377.
- RIVIERE J., SUBTIL J.C., CATROUX., 1974. *Ann. Agro.*, 25 (2-3), 383-401.
- RUSSEL E.G., 1979. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37 (2), 187-193.
- SALINITRO J.P., BLAKE I.G., MUIRHEAD P.A., 1978. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 (1), 79-84.
- SPOELSTRA S.F., 1978. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35 (5), 841-846.
- VAN DYKE M.I., MCCARTHY A.J., 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (4), 2049-2053.
- WHITEHEAD T. R., COTTA M., 2001. *Anaerobe*, 4, 181-187
- WOOD J., SCOTT K.P., AUGUSTIN G., NEWBOLD C.J., FLINT H.J., 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (10), 3682-3689.
- ZUMSTEIN E., MOLETTA R., GODON J.J., 2000. *Environmental Microbiology*, 2 (1), 69-78.