



initiatives
énergie
environnement

IMPACTS SANITAIRES DE LA METHANISATION AGRICOLE

Revue bibliographique

Juin 2019

Adeline HAUMONT; Florian Lafoux
AILE, 19B Boulevard Nominoë, 35740 PACE
info@aile.asso.fr

Contexte

Cette revue bibliographique a été réalisée dans le cadre d'une étude portant sur les enjeux sanitaires de la méthanisation et les impacts de l'hygiénisation réalisée entre novembre 2018 et juin 2019. Le rapport complet de l'étude peut être obtenu sur demande auprès de l'association AILE à l'adresse suivante : info@aile.asso.fr

Remerciements

Les auteurs remercient le comité de relecture et de suivi et leurs contributions :

- Anne-Marie Pourcher et Céline Druilhe (IRSTEA de Rennes)
- Arnaud Diara (ATEE Club Biogaz)
- Jean-Yves Gardoni, Servane Lecollinet, François Trubert (AAMF)

Table des matières

I.	ELEMENTS GENERAUX.....	3
A.	METHODOLOGIE.....	3
B.	BIBLIOMETRIE.....	3
II.	LES FACTEURS INFLUENÇANT LA SURVIE DES PATHOGENES.....	5
A.	LA TEMPERATURE ET LE TEMPS DE SEJOUR.....	5
B.	LA COMPOSITION DU MILIEU DE DIGESTION : PH, AGV ET INHIBITEURS.....	5
C.	LA COMPETITION MICROBIENNE ET L'ACCES AUX NUTRIMENTS.....	6
D.	LA QUALITE INITIALE DU SUBSTRAT.....	6
E.	LE TYPE DE PROCEDE : BATCH VS INFINIMENT MELANGE, BRASSAGE.....	6
F.	LE TYPE DE PATHOGENE RECHERCHE.....	6
III.	TAUX DE REDUCTION SUR CERTAINES BACTERIES INDICATRICES ET CERTAINS VIRUS.....	8
A.	BACTERIES VEGETATIVES.....	8
B.	LES BACTERIES SPORULANTES.....	11
C.	LES VIRUS.....	13
D.	PARASITES.....	17
IV.	EFFETS DE L'HYGIENISATION.....	17
A.	EFFICACITE DU TRAITEMENT THERMIQUE.....	17
B.	RISQUES DE RECONTAMINATION.....	17
V.	CONCLUSION.....	19
	Références bibliographiques.....	20

I. ELEMENTS GENERAUX

A. METHODOLOGIE

L'étude s'est déroulée entre novembre 2018 et mars 2019. Une cinquantaine d'articles ont été lus et synthétisés, en se basant sur les mots clés suivants : Anaerobic digestion, Sanitation, Pathogenic bacteria, Indicators bacteria, Virus, Pathogens, Hygiene, Digestate

A ces mots clés se sont ajoutés la recherche d'articles spécifiques sur les conditions de survie de pathogènes préoccupants : African Swine Fever Virus, Mycobacterium Avium Paratuberculosis, Clostridium Botulinum, Influenza Aviaire High Pathogenic Virus

B. BIBLIOMETRIE

- Les sources documentaires

L'étude bibliographique a porté sur plusieurs types de sources :

- Des articles scientifiques publiés se basant sur des données issues d'analyses laboratoires (21 articles), d'échantillonnages sur des sites industriels (11 articles) ou de revues bibliographiques (4 articles)
- Des rapports de projets, articles techniques et revues bibliographiques non publiés (une quinzaine de sources)
- Des articles scientifiques et rapports techniques portant sur les conditions de survie de certains pathogènes (une dizaine de sources)

Nombre de publications	Echelle « industrielle »	Echelle laboratoire
Psychrophile (<25°)	1	5
Mésophile	9	16
Thermophile	4	11

Certains articles mêlent des essais laboratoires et des échantillonnages de sites industriels et plusieurs articles testent différents régimes de température.

Cette revue s'est intéressée plus particulièrement à la qualité sanitaire des digestats de méthanisation agricole mais certaines données sont également issues d'analyses de digestats issus de la digestion d'effluents urbains. Cette revue ne se veut pas exhaustive, mais doit dresser les principales tendances des connaissances scientifiques sur le sujet.

Les résultats exprimés dans les publications sont en fonction des objectifs recherchés par les auteurs : s'il s'agit de prouver une efficacité de traitement, un facteur de réduction (généralement exprimé en base logarithmique) est exprimé, pour un temps de séjour déterminé. Il est important de préciser que bien souvent les temps de séjour sont largement inférieurs aux réalités de terrain. Dans la plupart des publications qui traitent d'analyses à l'échelle laboratoire ou pilote, en mésophile les temps de séjour considérés sont de l'ordre d'une vingtaine de jours. Hors dans le contexte Français, les temps de séjour moyens pour les unités agricoles sont supérieurs à 50 jours¹. Lorsqu'il s'agit de comparer des procédés entre eux ou comparer la résistance de pathogènes entre eux, les résultats peuvent être exprimés par leur T90 ou temps de réduction décimal (temps nécessaire pour diviser par 10 la population de départ).

¹ Enquête PRODIGE Chambres d'agriculture, 2018 : temps de séjour moyen de 53 jours (digesteur seul) et 122 jours si on considère digesteur + post-digesteur

- Les tendances

Depuis la revue bibliographique réalisée par Solagro en 1998 pour l'ADEME, de nombreuses publications ont vu le jour et l'état des connaissances s'est grandement amélioré. Il n'en demeure pas moins que les conclusions restent les mêmes : **globalement, la qualité sanitaire des digestats de méthanisation agricole est compatible avec l'épandage sur des terres agricoles, les concentrations de nombreux pathogènes diminuent, et restent identiques pour les pathogènes les plus résistants.** La revue bibliographique de Fröschle et al (2015) conclue notamment dans ce sens. **La digestion thermophile assure un plus fort abattement des pathogènes qu'en régime mésophile.**

Il est cependant difficile de généraliser, car l'impact de la digestion anaérobie dépend de nombreux facteurs, et diffère suivant les pathogènes. En conditions laboratoires, de nombreux pathogènes vont être réduits en moyenne d'un facteur 100 (Réduction de 2 log) mais certains pathogènes plus résistants ne seront pas réduits. Dans sa revue bibliographique, L. Sahlstrom (2003) rappelle la difficulté de trouver un bon indicateur qui donne une vision globale de la qualité sanitaire des digestats. Les entérocoques intestinaux (*Enterococcus*), autrefois appelés faecal streptococci (FS) sont des indicateurs pertinents d'après Bendixen (1998) et L.Sahlsröm (2003) , mais ne sont pertinents que pour des températures de traitement inférieures à 55°C (donc pas adapté dans le cas de d'hygiénisation).

- Les difficultés d'analyses

Il est à noter que les études de terrain rapportent essentiellement des données de prévalence (présence / absence des pathogènes) et non une quantification en raison de la lourdeur des méthodes de dénombrement. Par ailleurs, lorsque leur nombre est proche du seuil de détection de la méthode, les bactéries pathogènes peuvent ne pas être détectées dans les échantillons analysés. Ce biais analytique peut conduire à des interprétations erronées de la survie des pathogènes. Il est en effet possible que le pathogène, présent dans l'intrant et dans le digestat ne soit détecté que dans ce dernier, suggérant à tort, une éventuelle augmentation des concentrations au cours de la méthanisation.

Enfin, l'extrapolation de résultats de laboratoire à l'échelle réelle soulève certaines questions :

- si le microorganisme pathogène (virus, bactéries..) dont on cherche à étudier la survie au cours du procédé est ensemencé à forte concentration et qu'il n'y a pas de disparition totale, cela signifie-t-il que l'on retrouve fréquemment ce pathogène dans les digestats épandus dans les champs ?
- la survie des pathogènes inoculés en laboratoire est-elle la même que celle des souches indigènes ? Il semblerait que cela dépende des pathogènes. Les dynamiques de croissance en conditions laboratoire et à l'échelle industrielle pourrait être différentes selon Bonetta *et al.* (2014)
- avant de se retrouver sur les parcelles, le digestat est stocké (pendant parfois plusieurs mois) puis transporté et épandu. La qualité sanitaire du digestat épandu diffère-t-elle de celle du digestat issu du méthaniseur ?

II. LES FACTEURS INFLUENÇANT LA SURVIE DES PATHOGENES

Dans sa revue bibliographique, Sahlström (2003) met en avant la température, le temps de séjour, le pH, les acides gras volatiles (AGV), le process en continu ou batch, les espèces bactériennes, la disponibilité en nutriment et la quantité initiale de pathogènes comme des paramètres qui influencent la réduction des pathogènes pendant la digestion anaérobie.

A. LA TEMPERATURE ET LE TEMPS DE SEJOUR

La température est souvent citée comme le paramètre le plus important influençant la survie des pathogènes, surtout pour les bactéries (Avery et al., 2014 ; Fröschle et al., 2005 ; Sahlstrom, 2003 ; Kearney et al., 1993, McKain and Hobson, 1987, Sorlini et al., 198,)

Les pathogènes d'origine intestinale sont souvent adaptés à des températures de l'ordre de 30 à 40 °C. Par conséquent des températures supérieures à 40 °C causent généralement une réduction du taux de croissance, une inhibition ou destruction des pathogènes. Ce qui n'est pas le cas pour des formes résistantes comme les spores qui sont capables de résister à des températures extrêmes. Plus le temps de digestion est important plus les pathogènes sont exposés à ces conditions, ce qui intensifie l'effet d'inactivation. L'effet température est donc indissociable du temps de séjour.

La réduction des pathogènes est de ce fait plus importante dans la plage thermophile (>50°) qu'en mésophile. En régime mésophile, d'autres facteurs peuvent prendre le relais pour influencer sur la réduction des pathogènes : la compétition microbienne, la composition du milieu environnant (Orzi et al., 2015 ; Smith et al., 2005)

Pour les bactéries, le temps de réduction décimal (T90) est de quelques jours. Une augmentation de 5 °C (passage de 30 à 35 °C) réduit considérablement cette durée. (Sahlstrom, 2003) De même, une augmentation sensible de la température en thermophile peut aussi avoir des impacts importants (Couturier et Galtier, 1998)

Pour la même température (35°C), Chen *et al.* (2012) ont mesuré les concentrations en *E.coli* et *Salmonella* sp. après 11, 16 et 25 jours et ont observé une augmentation du taux de réduction avec l'augmentation du temps de séjour, mais n'ont pas vu d'effet pour *Shigella* sp.

B. LA COMPOSITION DU MILIEU DE DIGESTION : PH, AGV ET INHIBITEURS

Certains composés intermédiaires de la digestion anaérobie ont également un effet hygiénisant et affectent la survie des bactéries : c'est le cas notamment des acides gras volatils, des alcools et des sulfites qui sont produits au cours de la digestion (Sahlström, 2003, Fröschle et al. 2005) Pendant la digestion, des sulfates (SO_4^{2-}) sont réduits en sulfure (S^{2-}) par les bactéries sulfato-réductrices. Le sulfure est toxique pour les rotavirus et plusieurs groupes bactériens.

Le pH a également un rôle : la plupart des bactéries sont en conditions favorables à pH neutre, soit la même gamme de pH recherchée pour la digestion anaérobie. Une augmentation de pH pourra jouer un rôle dans l'équilibre ammonium/ammoniac, en faveur de l'ammoniac, qui est toxique pour de nombreuses bactéries pathogènes mais aussi pour les bactéries méthanogènes. Le facteur pH ne sera donc pas de nature à jouer un rôle dans la maîtrise du risque sanitaire.

Une concentration importante en ions métalliques peut être néfaste pour les pathogènes (Chen et al, 2012). L'accumulation de sels, qui augmente la pression osmotique, inhibe la digestion et le développement des pathogènes par les mêmes mécanismes. Néanmoins plusieurs auteurs cités par Fröschle et al (2005) montrent une possible adaptation de la flore microbienne dans les digesteurs sur le long terme à certains inhibiteurs, qui seront néfastes aux pathogènes contenus dans les intrants.

C. LA COMPETITION MICROBIENNE ET L'ACCES AUX NUTRIMENTS

Le développement de la flore bactérienne dans les digesteurs peut « faire barrière » au développement d'organismes pathogènes notamment en utilisant le carbone, l'azote et les micronutriments qui ne seront plus disponibles pour le développement des pathogènes. **Ainsi, le moindre accès aux nutriments participe à la réduction des pathogènes** (Smith et al., 2005)

D. LA QUALITE INITIALE DU SUBSTRAT

Le taux de réduction sur les pathogènes dépend également de la concentration initiale dans les effluents (Horan et al., 2004). Plus les concentrations en pathogènes sont importantes, plus il y a des risques de retrouver des pathogènes en sortie. **La maîtrise de la qualité des intrants, liée à la bio-sécurité dans les élevages est donc un facteur clé de maîtrise du risque**. Si les micro-organismes sont fixés sur des éléments grossiers, les matrices solides peuvent protéger les pathogènes des stress extérieurs et ceux-ci survivent plus longtemps dans les digesteurs. (Fröschle et al., 2005)

Dans une autre publication, on ne voit pas de corrélation claire entre ration entrante et concentration en bactéries entériques dans le digestat, mais la recherche n'a porté qu'à faire varier la proportion de biodéchets par rapport à du lisier de porcs (Dennehy et al., 2018)

E. LE TYPE DE PROCEDE : BATCH VS INFINIMENT MELANGE, BRASSAGE

La digestion en infiniment mélangé a la particularité, d'une part d'assurer un renouvellement des nutriments réguliers par l'incorporation de substrats frais, d'autre part par le soutirage régulier de digestat. Il est donc difficile de s'assurer que tous les micro-organismes pathogènes subissent le temps de séjour annoncé. Il en résulte que globalement, **quel que soit le régime de température, la réduction des pathogènes est plus importante en batch qu'en infiniment mélangé**.

Les expérimentations de Kearney et al., (1993) montrent un T90 plus court pour la digestion en batch que semi-continue. Les revues bibliographiques de Salhstrom (2003) et de Couturier et Galtier (1998) concluent à partir des travaux de Kearney et al. et d'Olsen et al (1985) que la digestion en batch est plus efficace qu'en infiniment mélangé pour la réduction de pathogènes.

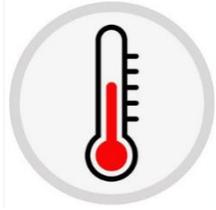
Les travaux de Jing *et al* (2018) ont regardé l'abattement des entérocoques en fonction du mélange de substrats entrants avec un procédé de type voie solide discontinue. Le mélange entrant était composé de biodéchets en quantité variable ajouté à du lisier de porcs ou de la boues anaérobies deshydratées. Un abattement >2 Log a été observé dès le 4^{ème} jour, quel que soit le mélange entrant. La concentration en entérocoque diminue plus rapidement avec le mélange biodéchets + lisier de porcs.

Un brassage efficace, en assurant un développement de la flore bactérienne et archéenne impliquée dans la production de méthane permettra d'améliorer la performance de la digestion anaérobie vis-à-vis des pathogènes non sporulants.

F. LE TYPE DE PATHOGENE RECHERCHE

Enfin, les taux de réduction diffèrent selon les pathogènes, et selon leur résistance aux conditions de l'environnement. De nombreuses publications se sont intéressées à *E.coli* ou *Salmonella*, ainsi qu'aux entérocoques intestinaux, comme indicateurs d'efficacité de traitement. Certaines publications s'intéressent aux virus courants. De nombreux virus sont extrêmement sensibles à une augmentation de température, la digestion anaérobie, même en mésophile aura donc un effet hygiénisant certain. Mais là encore, l'effet est variable suivant le type de virus.

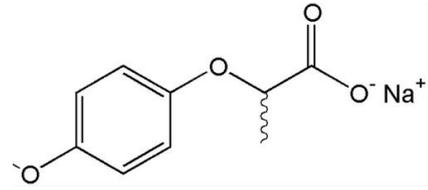
PRINCIPAUX PARAMETRES INFLUENÇANT LA SURVIE DES PATHOGENES LORS DE LA DIGESTION ANAEROBIE



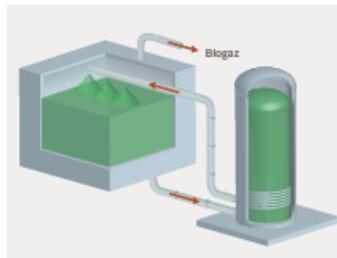
T°



pH



AGV



Process



Temps de séjour

III. TAUX DE REDUCTION SUR CERTAINES BACTERIES INDICATRICES ET CERTAINS VIRUS

A. BACTERIES VEGETATIVES

En mésophile

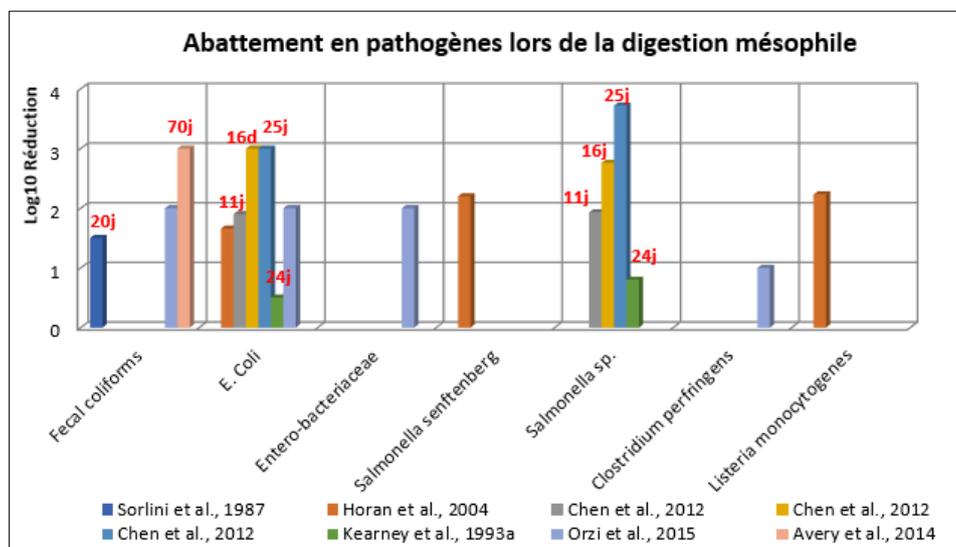
Pour les bactéries, le temps de réduction décimal (T90) est de quelques jours dans la plage mésophile pour les streptocoques et les coliformes fécaux. (Couturier et Galtier, 1998) Pour ces bactéries entériques, les taux de réduction sont en général de 1 à 2 log10 (Taux de réduction de 90% à 99%) (Sorlini et al., 1987)

Dans les expérimentations de Horan *et al.* (2004) qui ont porté sur la digestion de boues primaires urbaines, ils ont montré des taux de réduction de 1,66 Log10 pour *E.coli*, 2.2 pour *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Senftenberg, mais pas d'impact sur *Campylobacter jejuni*. Une étape de digestion secondaire permet d'augmenter les taux de réduction.

Coelho et al. (2018) ont étudié la qualité de digestats provenant de 11 unités de méthanisation de différentes typologies du Royaume Uni et d'Irlande fonctionnant en régime mésophile. *Salmonella* spp n'a été retrouvée que dans un échantillon, à faible concentration (7CFU/10g poids frais). Les valeurs en *E.coli* sont faibles, seuls 2 échantillons prélevés sur les 11 digesteurs ont plus de 23 E.Coli/g. Leurs concentrations en *E. coli* sont de 460 et 2400 CFU/g . Cela confirme les analyses effectuées sur les digestats de méthanisation agricole en France lors des programmes DIVA (2015) et VALDIPRO (2014).

Bonetta et al (2014) rapportent des fréquences de détection moins importantes dans les échantillons de digestat que dans les effluents bruts pour *Salmonella*. *E. coli* et *Yersinia spp* n'ont pas été détectés. D'après cette étude, *Listeria monocytogenes* serait moins impactée par la digestion mésophile. Dans une autre étude menée par Orzi et al (2015) sur 8 sites de méthanisation agricole mésophile alimentés avec des lisiers bovins (2 sites) ou porcins (6 sites) la prévalence de *Salmonella*, de *L. monocytogenes* et de *Yersinia enterocolitica* (comprise entre 25 et 37,5% dans les lisiers) n'a pas été affectée par la méthanisation mésophile.

L'expérimentation conduite par Smith et al., 2005 montre quant à elle que *E. coli* et *Salmonella spp.* sont peu réduits dans les gammes de températures mésophiles. La compétition microbienne et la restriction en substrat semblent être les paramètres primordiaux pour la réduction de la viabilité des bactéries entériques à ces températures.



Impact sur différentes bactéries en conditions mésophile

Bactérie	Conditions opératoires	Type d'effluent	Observation	Référence
E.coli et Entérocoques	35°C - 20 jours	Lisiers bovins	-1 à -2 log10	Sorlini et al. (1987)
E.coli et Entérocoques	Batch 35°– 50 jours	Lisiers bovin	-2 à -4 log10	
E.Coli	34-36°C – 12 jours	effluents urbains	- 1,66 log10	Horan et al., 2004
Salmonella Senftenberg	34-36°C – 12 jours	effluents urbains	-2,23 log10	Horan et al., 2004
Listeria monocytogenes	34-36°C – 12 jours	effluents urbains	-2,23 log10	Horan et al., 2004
E.coli	35°C – 11 à 25 jours	effluents urbains	-1,9 à -3 log10	Chen et al., 2012
Salmonella sp.	35°C - 11 à 25 jours	effluents urbains	-1,9 à -3 log10	Chen et al., 2012
E.coli	Echelle réelle 28°C -24 jours	Lisiers bovins (majoritaire) + lisier porcs, volaille, déchets pommes de terre	-0.5 log10	Kearney et al., 1993a
Salmonella typhimurium			-0.7 log10	
Yersinia enterocolitica			-1.4 log10	
Listeria Monocytogenes				
Campilobacter jejuni			Stable	
Enterobacteriaceae	Echelle réelle	Codigestion agricole	-1 à -2 log10	Orzi et al, 2015
Fecal coliform	20 à 70 j – 39-42°C		-1 à -3 log10	
E.coli			-1 à -3 log10	
Clostridium perfringens			+1 à -1 log10	
E.coli O157 :H7	Echelle réelle	Co-digestion à base de lisier bovin	Absente	Bonetta et al., 2014
Salmonella	Digestion 2 étapes		S= 20% / D= 8%	
Listeria monocytogenes			S= 20% / D= 8%	
Yersinia spp.			Absente	
Salmonella typhimurium	35°C	Biodéchets	T90 = 2.3 jours	EFSA, Thermorsuizen et al., 2003
Enteroccus faecalis	35°C	Lisier	T90 = 2 jours	EFSA, Bendixen et al., 1992
Enteroccus faecalis	35°C	Lisier de porcs + biodéchets	T90 = 74-93 jours	EFSA, Hoferer et al., 1992
E.coli	35°C	Lisier	T90 =1.8 jours	EFSA, Bendixen et al., 1992
Salmonella Dublin	35°C	Lisier	T90 =2.1 jours	EFSA, Bendixen et al., 1992
Salmonella Senftenberg	35°C	Lisier de porcs + biodéchets	T90 =27.6 jours	EFSA, Hoferer et al., 1992
Salmonella typhimurium	35°C	Lisier	T90 =2.4 jours	EFSA, Bendixen et al., 1992
Staphylococcus aureus	35°C	Lisier	T90 =0.9 jours	EFSA, Bendixen et al., 1992

Impact sur différentes bactéries en conditions thermophile

Bactérie	Conditions opératoires	Type d'effluent	Observation	Référence
<i>E.coli</i>	55°C	Effluents urbains	T90 <8 min Plus détectable au bout d'1 heure	Smith et al, 2005
<i>Salmonella</i>	55°C	Effluents urbains	T90 <8 min Plus détectable au bout d'1 heure	
<i>Faecal Streptococci</i> (enterocoques)	Echelle réelle 56°C – 20 jours	Codigestion agricole	-3.2 log 10	Bendixen, 1996
	Echelle réelle 53°C – 14 jours		-5 log 10	
	Echelle réelle 53°C – 19 jours		-4.6 log 10	
	Echelle réelle 52°C – 15 jours		-3.6 log 10	
Fecal coliform	55°C – 20 jours	Effluents urbains	-5 log10	Scaglia et al., 2014
Fecal coliform	55°C – 60 jours		-5 log 10	
Salmonella sp.	55°C – 20 jours		Abs	
Salmonella sp.	55°C – 60 jours		Abs	
Total coliform	54°C – 20 jours	Effluents urbains	Plus détectable	Llioret et al, 2015
E. coli			Plus détectable	
C. perfringens spores			0 à -1 log10	
Salmonella spp.			Plus détectable	

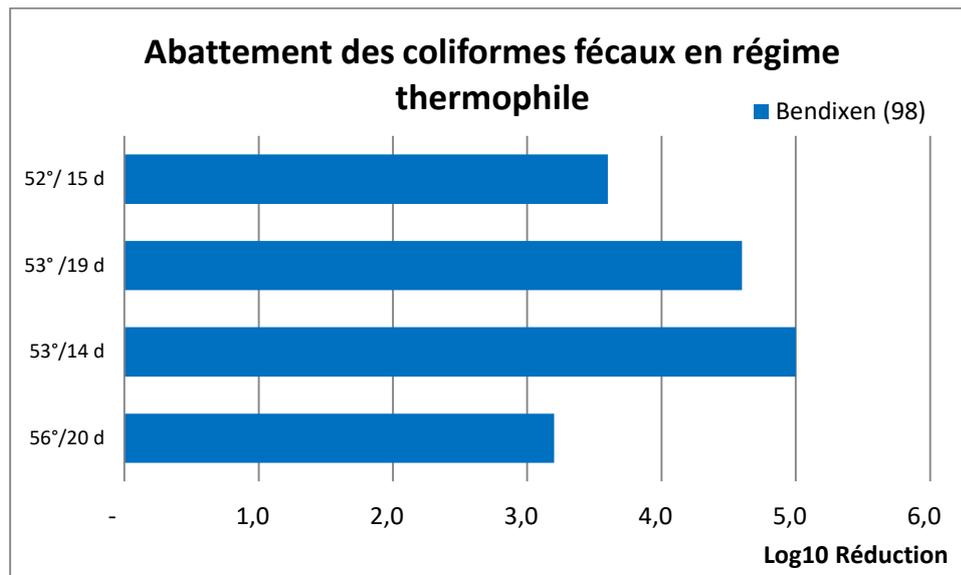
En thermophile

En thermophile, le T90 est de quelques heures pour les streptocoques et coliformes fécaux.

Smith et al., 2005 observent une inactivation rapide des *E. coli* et des salmonelles lors d'une digestion anaérobie thermophile.

Scaglia et al., 2014 confirment que la digestion anaérobie thermophile conduit à de bonnes performances d'hygiénisation des boues.

Lloret et al., 2013 constatent que la digestion anaérobie thermophile élimine les *E. coli* et les salmonelles.



B. LES BACTERIES SPORULANTES

Les Clostridium

Les bactéries ayant la capacité de sporuler, sont, en toute logique, résistantes à une augmentation de température, que ce soit à 35, 55 ou 70°C. C'est le cas notamment des *Clostridium*. De nombreuses bactéries appartenant au genre *Clostridium* sont impliquées dans la digestion anaérobie, ce sont des bactéries anaérobies, souvent anaérobies strictes, et il est donc normal, que si les substrats en contiennent, elles se retrouvent dans le digestat.

Dans la revue bibliographique de Fröschle et al. (2015) les résultats de plusieurs études portant sur les *Clostridium* sont rapportés. *Clostridium perfringens* est une bactérie ubiquiste, que l'on retrouve dans l'environnement et notamment dans les sols, de par sa capacité à sporuler. Bagge et al. (2005) ont retrouvé des concentrations identiques en *Clostridium perfringens* dans des unités de méthanisation avant et après digestion, en mésophilie aussi bien qu'en thermophilie.

Une étude conduite sur 154 unités de méthanisation en Allemagne a montré l'absence de *C. botulinum* dans les analyses. En revanche, *Clostridium difficile* a été détecté dans 44% des échantillons. Une analyse en laboratoire a également montré une durée de réduction décimale de *C. botulinum* de 34,6 jours à 38 °C et de 1 jour à 55 °C. Myllykoski *et al.* 2009 indiquent que le risque de retrouver *Clostridium botulinum* est lié à la présence de carcasses d'animaux morts dans les ensilages. En conséquence, la mise en place de pratiques de biosécurité dans les élevages et sur les sites de méthanisation est primordiale pour prévenir des risques liés au botulisme.

Bactéries du groupe *Bacillus cereus*

En 1998, Couturier et Galtier citaient déjà *Bacillus cereus* comme bactérie résistante à la température, même en thermophilie. *Bacillus cereus sensu lato* est un groupe de bactéries qui comprend plusieurs espèces apparentées dont *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus thuringensis*. Ce sont également des bactéries sporulantes que l'on peut retrouver dans l'environnement, les sols et les déjections animales. Elles ne sont pas affectées par la digestion anaérobie et résistent à l'hygiénisation. (Fröschle *et al.*, 2015)

Mycobacterium Avium Paratuberculosis (MAP)

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP), l'agent responsable de la paratuberculose chez les ruminants, est également une bactérie sporulante très résistante dans l'environnement.

La durée de vie en condition de stockage du MAP dans un lisier de bovin peut atteindre 98 jours à 15 °C et 252 jours à 5 °C. La réduction d'un log₁₀ pour les MAP est atteinte après 5 à 6,5 jours ce qui est plus long que pour d'autres pathogènes comme *E.coli*. L'épandage d'un lisier contaminé peut entraîner une contamination des parcelles sur du long terme (années).

Lors d'une expérience en batch réalisé par Olsen et al (1985), en condition de digestion mésophile (35 °C) les MAP restent dénombrables jusqu'au 21^{ème} jour et ne le sont plus au 28^{ème} jour. En thermophile, les MAP ne sont plus détectés au bout de 24 heures. Par conséquent, dans le cas d'une digestion anaérobie semi-continue thermophile avec un intervalle entre l'incorporation et l'évacuation de 24 heures, le process peut assurer une complète destruction des MAP. Au contraire, un process mésophile avec un intervalle de 1 à 2 jours maximum ne permet pas d'assurer la destruction des MAP.

Une comparaison a été faite entre process mésophile (42 °C) en une étape (temps de séjour de 60/65 jours) et en deux étapes (1 temps de séjour de 45/50 jours et un second temps de séjour dans un post-digester à 40 °C de 20/30 jours). Des MAP viables ont été retrouvés dans le digestat du processus en une étape tandis qu'aucun ne fut trouvé dans celui en deux étapes.

A échelle réelle, des traces d'ADN ont été retrouvées 12 mois après l'incorporation d'un fumier contaminé dans le digestat d'une installation mésophile (41 °C pendant 50 à 60 jours et post-digester 25 à 30 jours) mais plus de cellules viables au bout de 2 mois. Or cet ADN peut provenir de deux sources : de cellules mortes ou de cellules viables mais en nombre inférieur au seuil de détection.

Enfin citons l'étude réalisée par Carine HAAS du GDS 88. Cette étude portait sur 3 sites de méthanisation qui utilisaient respectivement les effluents de quatre, deux et six exploitations. Pour le premier site, une des quatre exploitations était touchée par la paratuberculose. Pour le second, les deux étaient concernées, pour le troisième, c'était trois sur six.

Sur les nombreuses analyses réalisées durant cette enquête, 7 échantillons de digestats sont sortis positifs en PCR². Mais la mise en culture qui a suivi n'a donné qu'un résultat faiblement positif et 6 négatifs. Une mise en culture est donc nécessaire pour pouvoir qualifier de potentiellement contaminant un digestat. L'auteur soulève la question de la dose minimale pour infecter un animal.

Des études complémentaires sont à mener pour répondre à ces questions. (Bonhotal et al., 2011; Mazzone et al., 2018; Michel et al., 2005; Olsen et al., 1985; Slana et al., 2011; Whittington et al., 2004)

² PCR : Polymérase Chaîne Réaction. Technique d'amplification enzymatique qui permet à partir de l'ADN ou ARN de mesurer la présence de bactéries ou virus

C. LES VIRUS

Sassi et al. (2018) ont étudié l'impact de la digestion mésophile et thermophile sur différents virus inoculés dans des effluents urbains. Les bactériophages sont considérés par ces auteurs³ comme de bons indicateurs représentatifs des virus entériques. En mésophile, les taux de réduction des bactériophages sont de l'ordre de 5,9 à 6,6 Log10 pour des taux de réduction de 1,8 à 2,2 Log10 sur des virus animaux. En thermophile des taux de réduction >4Log10 sont observés sur les virus animaux.

Dans l'étude de Bötner et Behlsam (2012), la température est citée comme le paramètre le plus important qui influe sur la survie des virus animaux. En mésophile, les temps d'inactivation vont de quelques heures à une journée alors qu'en thermophile, ils sont inactivés en moins d'une heure. Il existe une exception pour le PPV, virus de la parvovirose porcine, qui nécessite 8 jours à 55°C et 21 semaines à 35°C pour être totalement inactivé.

McKain and Hobson (1987) expliquent que les entérovirus porcins sont largement désactivés au bout d'une à deux journées et que certains persistent jusqu'à 9 jours pendant une digestion anaérobie mésophile. En thermophile, ils sont totalement inactivés au bout d'une heure. Lund *et al.* (1996) montrent qu'il faut 23 heures à 35°C pour atteindre un taux de réduction de 4Log10 contre moins d'une demi-heure à 55°C.

Le rapport de l'EFSA (2007) dresse une liste de T90 pour différents virus qui sont pour la plupart en dessous de 24 heures, sauf pour le parvovirus bovin.

Inactivation délai	M [35-40]	T [50-55°]
Porcine Parvovirus	21 semaines	11-12 hrs
Peste porcine classique	4 hrs	5 min
Bovine Enterovirus	23 hrs – 8 jr	<0,5 hrs
BVD diarrhée virale bovine	3 hrs	5 min
Fièvre aphteuse	24 hrs	<1 hr

Virus de la grippe aviaire (*Influenza Aviaire*)

Le virus de la grippe aviaire est un virus du groupe Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP). La résistance du virus dans les conditions de l'environnement diffère suivant les souches. Lors de l'épisode qui a affecté les élevages de palmipèdes en France à l'hiver 2015-2016, la souche H5N8 était impliquée. D'après l'étude conduite par l'ANSES Ploufragan et l'ITAVI, le virus peut persister jusqu'à 3 semaines dans les fosses à lisier en conditions extérieures. Les lisiers infectés peuvent donc être des sources de contamination potentielle.

Comme tous les virus de la grippe, IAHP est sensible à la température, mais aussi au pH, à la salinité, aux rayons UV, à la présence de matière organique. Ainsi, une combinaison de facteurs favorables associant une température basse, un pH neutre, l'absence d'exposition aux UV et une protection par un milieu riche en matières organiques favorise de manière importante la persistance des particules virales et le maintien de leur infectiosité (Anses - Saisine 2016-SA-0027, 2016). Une montée en température pourrait donc constituer un levier de maîtrise du risque.

³ Il n'y aurait pas de consensus scientifique sur ce point. (Communication personnelle avec AM. Pourcher)

Dans sa saisine de 2016, l'ANSES préconise les moyens de maîtrise suivants :

- le traitement en usine agréée de production de biogaz par méthanisation équipée d'une unité d'hygiénisation,
- le traitement par chaulage permettant d'atteindre un pH entre 10 à 12 pendant sept jours,
- l'assainissement naturel sur site par stockage minimum de 60 jours après abattage des animaux.

Le traitement par chaulage est à proscrire d'un point de vue environnemental, du fait du risque important de volatilisation de l'ammoniaque.

Nous n'avons pas trouvé de publication portant spécifiquement sur l'impact de la température sur H5N8. Dans l'étude de Davidson et al., (2010) portant sur H9N2 (une souche Israélienne), le passage à 37°C assure une inactivation du virus en 3 à 5 jours. Dans une étude portant sur une souche coréenne H5N1, le temps d'inactivation passe de plus de 100 jours à 4°C à une cinquantaine de jours à 30°C. Le taux de réduction décimal à 30°C est inférieur à 10 jours pour les 3 types de H5N1 étudiés. Des températures plus élevées n'ont pas été étudiées.

Virus de la peste porcine africaine (*African Swine Virus*)

African swine fever (ASF) est une maladie qui provoque des fièvres hémorragiques dévastatrice chez les porcs avec des taux de mortalité proches de 100% (Costard et al., 2009). Le virus est excrété dans les matières fécales des porcs infectés.

Ce virus a la capacité de rester longtemps dans des environnements riches en protéine et pour des pH compris entre 4 et 10.

Nous n'avons pas trouvé d'études spécifiques portant sur l'effet de la digestion anaérobie sur le virus de la peste porcine africaine. ASF est néanmoins sensible à la chaleur. Le temps de survie du virus de l'ASF varie entre 60 et 100 jours. Cette durée est dépendante de la température, du pH et de la charge initiale de pathogènes. Par exemple, une expérimentation a montré un temps de survie de 84 jours lors d'un stockage à 17 °C contre 112 jours à 4 °C.

Dans des études menées par Plowright et Parker (1967), il a été montré que le virus était inactivé (réduction de 5 log) en 90 min à 56 °C. Cependant, les travaux effectués par Turner et al. (1998) montrent qu'à des températures comprises entre 4 et 40 °C la population de virus reste stable, à partir de 50 °C il y a un déclin pour arriver à la présence de quelques traces au bout de 24h et à 60 °C au bout de 15 minutes il n'y a plus de virus détecté.

Il existe plusieurs méthodes d'inactivation :

- Des traitements thermiques avec une température d'au moins 60 °C et pendant au minimum 20 minutes ;
- Un stockage sur une longue période (jusqu'à 6 mois) mais sans ajout de lisier durant cette période, ce qui est contraignant comme méthode ;
- Un traitement par micro-ondes ou oligolyse qui sont au stade expérimental ;
- Une stabilisation aérobie thermophile ou digestion anaérobie thermophile ;
- Un compostage de la fraction solide.

La résistance du virus implique que le transfert de contamination peut avoir lieu par des vêtements, des véhicules ou des équipements contaminés. Néanmoins, la mise en place d'une bonne biosécurité prévient les risques.

(Bellini et al., 2016; Haas et al., 1995; Penrith and Vosloo, 2009; Turner and Williams, 1998)

Impact sur différents virus en conditions mésophile

Virus	Conditions opératoires	Type d'effluent	Observation*	Référence
Bactérophage MS2	21 jours – 32°C	Effluents urbains	R = 6,6 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Bactérophage ø6	21 jours – 32°C	Effluents urbains	R >5,9 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Adenovirus 4	21 jours – 32°C	Effluents urbains	R = 2 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Poliovirus 1	21 jours – 32°C	Effluents urbains	R = 1,8 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Murine norovirus	21 jours – 32°C	Effluents urbains	R = 2,2 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
FMDV (fièvre aphteuse)	35°C	lisiers bovins - porcins	I = 24 heures	Bøtner et Belsham (2012)
Porcine Parvovirus	35°C	lisiers porcins	I = 21 semaines	Bøtner et Belsham (2012)
CSVF (peste porcine classique)	35°C	lisiers porcins	I = 4 heures	Bøtner et Belsham (2012)
BVDV (diarrhée virale)	35°C	lisiers bovins	I = 3 heures	Bøtner et Belsham (2012)
SIV (grippe porcine)	35°C	lisiers porcins	I = 24 heures	Bøtner et Belsham (2012)
ECBO-Virus	30°C	lisiers bovins + biodéchets	D = 16 -43 heures	EFSA (d'après Hoferer 2001)
ECBO-Virus	30°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 23 -35 heures	EFSA (d'après Hoferer 2001)
ECBO-Virus	35°C	lisiers bovins + biodéchets	D = 11 -17 heures	EFSA (d'après Hoferer 2001)
Equine Rhinovirus	30°C	lisiers bovins + biodéchets	D = 14 -34 heures	EFSA (d'après Hoferer 2001)
Equine Rhinovirus	30°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 24 -26 heures	EFSA (d'après Hoferer 2001)
Poliovirus	30°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 22 -32 heures	EFSA (d'après Hoferer 2001)
Bovine Parvovirus	30°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 7,5 – 13,2 jours	EFSA (d'après Hoferer 2001)
Bovine Parvovirus	30°C	lisiers bovins + biodéchets	D = 1,4 -3,6 jours	EFSA (d'après Monteith <i>et al.</i> 1986)
FMDV (fièvre aphteuse)	30°C	lisiers bovins + biodéchets	D = 10 -13 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
FMDV (fièvre aphteuse)	30°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 5 -12 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
FMDV (fièvre aphteuse)	35°C	lisiers bovins + biodéchets	D = 6 13 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
FMDV (fièvre aphteuse)	35°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 5 -6 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
SVDV (maladie vésiculeuse)	30°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 23 -67 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
SVDV (maladie vésiculeuse)	35°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 12 -15 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
Pseudorabies Virus	30°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 1,4 -1,7 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
Pseudorabies Virus	35°C	lisiers porcins + biodéchets	D = 0,5 -1,4 heures	EFSA (d'après Moss <i>et al.</i> , 2000)
Influenza Aviaire H9N2	37°C		D= 2,9 – 4,7 jours	Davidson <i>et al.</i> , 2010
Influenza Aviaire H5N1	30°C		D= 4 – 9 jours	Paek <i>et al.</i> , 2010
Influenza Aviaire H5N1	30°C		I= 51 – 58 jours	Paek <i>et al.</i> , 2010

Impact sur différents virus en conditions thermophile

Virus	Conditions opératoires	Type d'effluent	Observation	Référence
Bactérophage MS2	5 jours – 55°C	Effluents urbains	7,1 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Bactérophage ø6	5 jours – 55°C	Effluents urbains	>5,9 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Adenovirus 4	5 jours – 55°C	Effluents urbains	>2,8 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Poliovirus 1	5 jours – 55°C	Effluents urbains	4,6 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
Murine norovirus	5 jours – 55°C	Effluents urbains	>4,1 log10	Sassi <i>et al.</i> (2018)
FMDV fièvre aphteuse	55°C	lisiers bovins - porcins	l < 1 heure	Bøtner et Belsham (2012)
parvovirus porcin	55°C	lisiers porcins	l = 8 jours	Bøtner et Belsham (2012)
CSVF (peste porcine classique)	55°C	lisiers porcins	l < 5 minutes	Bøtner et Belsham (2012)
BVDV (diarrhée virale)	55°C	lisiers bovins	l = 5 minutes	Bøtner et Belsham (2012)
SIV (grippe porcine)	55°C	lisiers porcins	l = 1 heure	Bøtner et Belsham (2012)

D. PARASITES

Les parasites sont beaucoup moins étudiés dans la littérature, et leur temps de survie dans l'environnement est généralement beaucoup plus long que pour les bactéries et les virus.

Dans les parasites sont regroupés des Helminthes (vers), des vers plats comme les cestodes (*taenia*) ou trématodes (*grande douve*), les nématodes (*ascaris*, *strongles*) ainsi que des protozoaires (*giardia*, *coccidie*, *cryptosporidie*..).

Bonetta et al (2014) dans l'échantillonnage d'une unité de méthanisation en mésophile sur effluents bovins n'ont relevé aucune trace d'œufs d'helminthes, ni dans les effluents bruts, ni dans les digestats.

L'étude conduite par Orzi et al (2015) sur 11 unités de méthanisation agricoles a cherché différents parasites et a trouvé dans les effluents bruts de 3 unités sur 10 des œufs d'*Ascaris*, *Stronglya*, ou des oocystes de *Coccidie*. Ces parasites peuvent se retrouver dans les digestats.

IV. EFFETS DE L'HYGIENISATION

A. EFFICACITE DU TRAITEMENT THERMIQUE

Plusieurs procédés hygiénisant ont été étudiés dans la littérature, allant de 55°C à 70°C et de 30 à 60 minutes. La pasteurisation, telle que définie par le règlement Européen doit être conduite à 70°C pendant 1 heure, en assurant une taille de particule <12mm.

Globalement, les étapes de pré-traitement réduisent les germes dans les substrats ce qui contribue à la qualité sanitaire du digestat. La pasteurisation est notamment très efficace pour éliminer les bactéries végétatives et les virus.

Dans une publiée par Bagge et al. (2005), des échantillons ont été prélevés sur quatre installations Suédoises de taille industrielle et hygiénisant des biodéchets et SPA de catégorie 3 ainsi que des lisiers et fumiers provenant de plusieurs exploitations (entre 5 en 20) en amont de la digestion. L'étape d'hygiénisation fonctionne en batch pour 3 unités sur 4 et en semi-continu pour 1 installation. 3 unités sur quatre fonctionnent en régime thermophile. Les échantillonnages ont eu lieu avant hygiénisation, après digestion, dans le stockage et dans les stockages décentralisés (sur les fermes). L'étape d'hygiénisation permet d'abattre significativement (en dessous du seuil de détection) les bactéries indicatrices non sporulantes. Seul un échantillon prélevé directement après pasteurisation contenait des bactéries du groupe *Enterococcus spp*, l'hypothèse d'un problème d'échantillonnage n'a pas été écarté. *Clostridium Perfringens* n'a pas été affecté par l'étape de pasteurisation.

Des études plus anciennes mentionnaient déjà que *Salmonella spp* ne pouvait pas survivre plus de quelques minutes à 70° (Bendixen, 1996 ; Mitscherlich and Marth, 1984).

Dans une étude visant à définir des indicateurs de traitement thermique, Watcharasukarn et al (2009) rapportent que *E.coli* passe en dessous des limites de détection en dix secondes. *Enterococcus faecalis* est plus résistant avec un maximum de réduction de 1.77 log 10 en 24 heures.

Néanmoins, l'hygiénisation à 70°C ne suffit pas pour éliminer les *Clostridium spp*. (Böhnel and Lube, 2000; Bianca Fröschle et al., 2015; Gessler and Böhnel, 2006; Neuhaus et al., 2015) Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* ne sont également pas affectées par l'hygiénisation (Fröschle et al, 2015)

B. RISQUES DE RECONTAMINATION

Bagge *et al.* et Sahlstrom mentionnent le risque de recontamination de digestat ayant subi une pasteurisation en post-digestion. On peut supposer que l'absence de compétition avec d'autres micro-organismes, en rendant le milieu stérile, laisse la place à des pathogènes extérieurs de se développer

dans le digestat. Dans l'étude de Bagge citée plus haut, l'hypothèse de la contamination via les engins de transport a été évoquée, le même type de Salmonelle (*Salmonella Agona*) ayant été retrouvé en amont de la pasteurisation et dans les stockages décentralisés.

Une pasteurisation après digestion semble donc plus risquée qu'en amont car plus propice à une contamination notamment pendant le transport, et prolifération des pathogènes, comme les Salmonelles ou les coliformes fécaux. (Sahlstrom, 2003) Dans les années 80, des problèmes de recontamination après pasteurisation ont été observés en station d'épuration. Dans ces cas relevés, les moyens de transports n'étaient pas correctement nettoyés. Ces auteurs mentionnent le placement en post-digestion de l'hygiénisation pour des raisons économiques, ce que nous étudierons dans le chapitre VI.

Ce risque était également cité dans la revue de Couturier et Galtier (1998) : « *Les Salmonelles peuvent se multiplier dans la boue stérile s'il n'y a pas de compétition avec d'autres bactéries (Carrington 1982) ou avec d'autres micro-organismes (Gadre, 1986).* »

V. CONCLUSION

D'un point de vue sanitaire, l'impact de la digestion anaérobie sur les effluents d'élevage est variable en fonction des microorganismes pathogènes et en fonction des procédés de digestion. La réduction en élément pathogène peut atteindre 99.99% pour certaines bactéries ou virus, alors que d'autres pathogènes résistants à la chaleur ne seront pas du tout réduits au cours de la digestion. D'un point de vue sanitaire, il faut retenir que les digestats sont de qualité au moins équivalente à celles des effluents bruts et améliorée pour certains pathogènes (*Salmonella*, *E.coli*...) Les procédés de digestion thermophile réduisent plus significativement les cellules végétatives, virus et parasites qu'en régime mésophile.

Le retour au sol des digestats doit donc se faire avec les mêmes bonnes pratiques d'hygiène que les épandages d'effluents bruts : pas de pâturage avant 21 jours sur des parcelles ayant reçu du digestat, ne pas manger ni boire sur les lieux d'épandage, mettre en place un plan de maîtrise sanitaire sur les unités de méthanisation.

Références bibliographiques

- Albihn, A., Vinnerås, B., 2007. Biosecurity and arable use of manure and biowaste — Treatment alternatives. *Livest. Sci.* 112, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.09.015>
- Anses - Saisine 2016-SA-0027, 2016. Avis de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des conditions d'assainissement des bâtiments d'élevage de volailles vis-à-vis du risque d'influenza aviaire.
- Avery, L.M., Anchang, K.Y., Tumwesige, V., Strachan, N., Goude, P.J., 2014. Potential for Pathogen reduction in anaerobic digestion and biogas generation in Sub-Saharan Africa. *Biomass Bioenergy* 70, 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.053>
- Bagge, E., Sahlström, L., Albihn, A., 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res.* 39, 4879–4886. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.016>
- Bendixen, H., n.d. Hygiene en sanitation requirements in Danish biogas plants.
- Bonetta, Si, Ferretti, E., Bonetta, Sa, Fezia, G., Carraro, E., 2011. Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products. *Appl. Microbiol.* 53, 552–557.
- Bonhotal, J. Schwarz, M., Stehman, S.M., 2011. How *Mycobacterium avium* paratuberculosis is affected by the composting process. *Trends Anim Vet Sci J* 2011 2(1):5-10
- Chen, Y., Fu, B., Wang, Y., Jiang, Q., Liu, H., 2012. Reactor performance and bacterial pathogen removal in response to sludge retention time in a mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 106, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.093>
- Coelho, J.J., Prieto, M.L., Dowling, S., Hennessy, A., Casey, I., Woodcock, T., Kennedy, N., 2018. Physical-chemical traits, phytotoxicity and pathogen detection in liquid anaerobic digestates. *Waste Manag.* 78, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.05.017>
- Côté, C., Massé, D.I., Quessy, S., 2006. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresour. Technol.* 97, 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.024>
- Couturier, C., Galtier, L., 1998. Etat des connaissances sur le devenir des germes pathogènes et des micropolluants au cours de la méthanisation des déchets et sous-produits organiques. 98.
- Davidson, I., S. Nagar, R. Haddas, M. Ben-Shabat, N. Golender, E. Lapin, A. Altory, L. Simanov, I. Ribshtein, A. Panshin and S. Perk., 2010. Avian Influenza Virus H9N2 Survival at Different temperatures and pHs. *Avian Diseases*. DOI: 10.1637/8736-032509-ResNote.1
- Dennehy, C., Lawlor, P.G., McCabe, M.S., Cormican, P., Sheahan, J., Jiang, Y., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018. Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics. *Waste Manag.* 71, 532–541. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.047>
- European Food Safety Authority (EFSA), 2007. Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the safety vis-à-vis biological risk of the mesophilic process of biogas and compost treatment of Animal By-Products (ABPs): Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the safety vis-à-vis biological risk of the mesophilic process of biogas and compost. *EFSA J.* 5, 465. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.465>
- Fröschle, B., Heiermann, M., Leubuhn, M., Messelhäusser, U., Plöchl, M., 2015. Hygiene and Sanitation in Biogas Plants, in: Guebitz, G.M., Bauer, A., Bochmann, G., Gronauer, A., Weiss, S. (Eds.), *Biogas Science and Technology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 63–99. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21993-6_3
- Gadre, R.V., Ranade, D.R., Godbole, S.H., 1986. A note on survival of salmonellas during anaerobic digestion of cattle dung. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb03364.x>
- Henry, D.P., Frost, A.J., Samuel, J.L., O'Boyle, D.A., Thomson, R.H., 1983. Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02651.x>
- Horan, N.J., Fletcher, L., Betmal, S.M., Wilks, S.A., Keevil, C.W., 2004. Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Res.* 38, 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.004>
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z., Zhan, X., Gardiner, G.E., 2018. Inactivation of enteric indicator bacteria and system stability during dry co-digestion of food waste and pig manure. *Sci. Total Environ.* 612, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.214>
- Kearney, T.E., Larkin, M.J., Frost, J.P., Levett, P.N., 1993a. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 215–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02768.x>
- Kearney, T.E., Larkin, M.J., Levett, P.N., 1993b. The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 86–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03000.x>

- Kunte, Yeole, Chiplonkar, Ranade, 1998. Inactivation of *Salmonella typhi* by high levels of volatile fatty acids during anaerobic digestion. *J. Appl. Microbiol.* 84, 138–142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00335>.
- Le Bouquin, S. Schmitz, A, Pertusa, M., Scoizec, A., Rousset, N., Eterradosi, N, 2017. Evaluation de la survie des virus Influenza aviaires H5N8 dans les lisiers d'élevages de palmipèdes gras. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n°80*.
- Lloret, E., Salar, M.J., Blaya, J., Pascual, J.A., 2013. Two-stage mesophilic anaerobic–thermophilic digestion for sludge sanitation to obtain advanced treated sludge. *Chem. Eng. J.* 230, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.066>
- Massé, D., Gilbert, Y., Topp, E., 2011. Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresour. Technol.* 102, 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.020>
- Mazzone, P, Corneli, S., Di Paolo, A. Maresca, C., Felici, A., Biagetti, M., Ciullo, M., Sebastiani, C., Pezzotti, G., Leo, S., Ricchi, M., Arrigoni, N., 2018. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the intermediate and final digestion products of biogas plants. *Journal of Applied Microbiology* 125, 36–44
- McKain, N., Hobson, P.N., 1987. A note on the destruction of porcine enteroviruses in anaerobic digestions. *Biol. Wastes* 22, 147–155. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(87\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0269-7483(87)90047-4)
- Olsen, J.E., Jorgensen, J.B, 1985. On the Reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in Bovine Slurry Subjected to Batch Mesophilic or Thermophilic Anaerobic Digestion. *Agricultural Wastes* 13 (1985)273-280
- Olsen, J.E., 1988. Studies on the reduction of pathogenic and indicator bacteria in liquid pig manure treated by sedimentation and anaerobic filter digestion for methane generation. *Biol. Wastes* 24, 17–26. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(88\)90023-7](https://doi.org/10.1016/0269-7483(88)90023-7)
- Orzi, V., Scaglia, B., Lonati, S., Riva, C., Boccasile, G., Alborali, G.L., Adani, F., 2015. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. *Sci. Total Environ.* 526, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.038>
- Paek, MR., Lee, YJ., Yoon, H., Kang HM., Kim, MC., Choi JG., Jeong, OM., Kwon, OS., Moon, OK., Lee, SJ., Kwon, JH., 2010. Survival rate of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses at different temperatures. *Poultry Science* 89 :1647–1650. doi: 10.3382/ps.2010-00800
- Pesaro, F., Sorg, I., Metzler, A., 1995. In Situ Inactivation of Animal Viruses and a Coliphage in Nonaerated Liquid and Semiliquid Animal Wastes. *APPL Env. MICROBIOL* 61, 6.
- Popat, S.C., Yates, M.V., Deshusses, M.A., 2010. Kinetics of inactivation of indicator pathogens during thermophilic anaerobic digestion. *Water Res.* 44, 5965–5972. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.045>
- Resende, J.A., Silva, V.L., de Oliveira, T.L.R., de Oliveira Fortunato, S., da Costa Carneiro, J., Otenio, M.H., Diniz, C.G., 2014. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresour. Technol.* 153, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.007>
- Sassi, H., 2018. Comparative survival of viruses during thermophilic and mesophilic anaerobic digestion. *Sci. Total Environ.* 615, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.205>
- Sahlstrom, L., 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 6.
- Scaglia, B., D'Imporzano, G., Garuti, G., Negri, M., Adani, F., 2014. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci. Total Environ.* 466–467, 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.114>
- Skillman, L.C., Bajsa, O., Ho, L., Santhanam, B., Kumar, M., Ho, G., 2009. Influence of high gas production during thermophilic anaerobic digestion in pilot-scale and lab-scale reactors on survival of the thermotolerant pathogens *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* in piggery wastewater. *Water Res.* 43, 3281–3291. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.031>
- Slana, I., Pribylova, R., Kralova, A., Pavlik, R., 2011. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a Farm-Scale Biogas Plant Supplied with Manure from *Paratuberculosis*-Affected Dairy Cattle. *Appl. & Env. Microbiol.*, May 2011, p. 3115–3119
- Smith, S.R., Lang, N.L., Cheung, K.H.M., Spanoudaki, K., 2005. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Manag.* 25, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.02.010>
- Sorlini, C., Allievi, L., Ranalli, G., Ferrari, A., 1987. A note on the removal of fecal bacteria in cattle slurry after different farm and laboratory treatments. *Biol. Wastes* 22, 39–47. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(87\)90098-X](https://doi.org/10.1016/0269-7483(87)90098-X)
- Traub, F., 1986. Method for Determining Virus Inactivation during Sludge Treatment Processes. *APPL Env. MICROBIOL* 52, 6.
- Turner, C., Burton, C.H., 1997. The inactivation of viruses in pig slurries: A review. *Bioresour. Technol.* 61, 9–20. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)84693-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)84693-7)

Watanabe, H., Kitamura, T., Ochi, S., Ozaki, M., 1997. Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions. *Water Sci. Technol.* 36, 25–32.