

Université de Montréal

**RISQUES BIOLOGIQUES ASSOCIÉS AUX ÉPANDAGES D'ENGRAIS DE
FERME DANS LES CULTURES MARAÎCHÈRES**

Par
CAROLINE CÔTÉ

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
(Ph.D.)

en sciences vétérinaires
option microbiologie

Avril 2005

© Caroline Côté, 2005



SF

607

U54

2006

v. 014

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

RISQUES BIOLOGIQUES ASSOCIÉS AUX ÉPANDAGES D'ENGRAIS DE
FERME DANS LES CULTURES MARAÎCHÈRES

Présentée par
CAROLINE CÔTÉ

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Denise Bélanger, présidente-rapporteuse

Sylvain Quessy, directeur de recherche

Alain Villeneuve, codirecteur

Alain Houde, membre du jury

Edward Topp, examinateur externe

Denise Bélanger, représentante du doyen de la FES

SOMMAIRE

Au cours des dernières années, des cas d'infections humaines ont été reliés à la consommation de fruits et légumes contaminés directement ou indirectement par des fumiers. L'évaluation du risque associé à cette pratique doit tenir compte de la capacité de survie des microorganismes pathogènes dans les fumiers et dans le sol. Cependant, peu de données ont été publiées dans la littérature scientifique à ce sujet.

Cette étude a été menée dans le but d'évaluer la survie des microorganismes indicateurs et pathogènes dans le lisier de porcs et le sol sous des conditions typiques de la production agricole québécoise. L'hypothèse de base était que l'utilisation du lisier de porcs pour fertiliser les cultures de légumes représente un danger pour la santé humaine et que des mesures doivent être prises pour réduire le risque.

Des échantillons de lisier de porcs ont été prélevés dans des fermes porcines pour l'évaluation de leur contenu microbiologique. Les microorganismes à l'étude étaient *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. La survie des microorganismes indicateurs et pathogènes dans des fosses extérieures commerciales a été évaluée. De plus, les engrais minéraux ont été remplacés par le lisier de porcs à différentes proportions dans la production du cornichon dans le but de vérifier l'impact de cette pratique sur la salubrité des légumes. Des échantillons de sol ont été prélevés à toutes les deux semaines après l'épandage pour fins d'analyses microbiologiques. L'innocuité des produits fut évaluée. Par ailleurs, l'impact de la digestion anaérobie psychrophile sur le contenu microbien du lisier de porcs a aussi été vérifié.

Les résultats ont démontré que le contenu en *E. coli* du lisier de porcs destiné à l'épandage est très variable (0 à 5.52 log₁₀ CFU/g). *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp ont été détectés dans 37%, 9% et 3% des échantillons respectivement. Une décroissance exponentielle des populations de *E. coli* a été observée dans le lisier de porcs entreposé et dans le sol. Dans les conditions de cette étude, le délai requis pour atteindre une réduction de 90% des populations de *E. coli* (T₉₀) dans le lisier de porcs entreposé au printemps a été estimé à 15 à 26 jours. La persistance maximale de *Salmonella* observée au cours de cette étude fut de 88 jours. Dans le sol, le délai estimé moyen requis pour atteindre des niveaux non-détectables de *E. coli* variait entre 56 et 70 jours dans le loam sableux et il fut de 77 jours dans le sable loameux. *E. coli* et *Salmonella* ne furent pas détectés sur les légumes.

Un entreposage d'un mois au printemps permet d'obtenir une réduction importante (90%) des populations de *E. coli* dans le lisier de porc. Ce délai ne garantit pas l'atteinte de niveaux non-détectables de *Salmonella* spp et *Yersinia enterocolitica*. Un délai de 100 jours entre l'épandage de lisier de porc frais et la récolte des légumes semble sécuritaire dans un loam sableux. Toutefois, le traitement préalable du lisier de porcs (entreposage ou digestion anaérobie) permettrait de réduire ce délai puisque la charge microbienne appliquée au sol serait réduite. Des données supplémentaires sont nécessaires pour déterminer un délai sécuritaire dans d'autres types de sol. La digestion anaérobie est une technique prometteuse pour réduire les populations de microorganismes indicateurs et pathogènes présentes dans le lisier de porcs.

Mots-clés: lisier de porcs, pathogènes, légumes, salubrité, traitement.

SUMMARY

In the past few years, human infections have been linked to the consumption of fruits and vegetables directly or indirectly contaminated by animal manure. The assessment of the risk that might be associated with this practice must take into account the capacity of pathogenic microorganisms to survive in manure and soil. However, very few data have been published in the scientific literature on that subject.

This study was undertaken in order to evaluate the persistence of indicator and pathogenic microorganisms in liquid hog manure and soil under conditions typical of agricultural production in Québec. The hypothesis was that the use of liquid hog manure to fertilize vegetables represents a human health hazard and that measures must be taken to reduce the risk.

Samples of liquid hog manure were obtained from hog operations for the evaluation of their microbiological content. Microorganisms included in the survey were: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. The persistence of indicator and pathogenic microorganisms in outdoor storage structures was evaluated. Also, mineral fertilizers were replaced by liquid hog manure at different ratios for the production of pickling cucumbers in order to verify the impact of liquid hog manure spreading on vegetables salubrity. Soil samples were taken at every two weeks after spreading for microbiological analysis. The innocuity of harvested products was evaluated. The impact of psychrophilic anaerobic digestion on the microbiological content of liquid hog manure was also verified.

Results showed that the *E. coli* content of liquid hog manure intended to be spread is highly variable (0 to 5.52 log₁₀ CFU/g). *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp were detected in 37%, 9% and 3% of samples respectively. An exponential decrease of *E. coli* populations was observed in stored liquid hog manure and in the soil. Under the conditions of this experiment, the predicted number of days required to obtain a 90% reduction of *E. coli* populations (T₉₀) in stored liquid hog manure in spring was estimated at 15 to 26 days. The maximal persistence of *Salmonella* observed during the experiment was 88 days. In soil, the estimated average time required to reach undetectable levels of *E. coli* varied from 56 to 70 days in the sandy loam while it was estimated at 77 days in the loamy sand. The maximal *Salmonella* persistence in soil was 54 days. *E. coli* and *Salmonella* were not detected in any vegetable sample.

A one month batch storage in spring permit to obtain an important reduction (90%) of *E. coli* populations in liquid hog manure. This storage duration does not guarantee non-detection of *Salmonella* spp and *Yersinia enterocolitica*. A delay of 100 days between fresh liquid hog manure application and vegetables harvest appears to be a safe practice on a sandy loam. However, liquid hog manure treatment (storage or anaerobic digestion) could lead to a reduction of this delay by reducing the initial quantity of microorganisms applied in the soil. More data are needed to determine a safe delay in other soil types. Anaerobic digestion of liquid hog manure is a promising method to reduce indicator and pathogenic microorganisms populations in liquid hog manure.

Keywords: liquid hog manure, pathogens, vegetables, salubrity, treatment.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiii
Chapitre 1 INTRODUCTION.....	1
Chapitre 2 RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	5
2. 1. La contamination microbiologique des fruits et légumes.....	6
2. 2. Contenu des engrais de ferme en microorganismes pathogènes et indicateurs.....	9
2. 2. 1. <i>Escherichia coli</i>	10
2. 2. 2. <i>Salmonella</i> spp.....	13
2. 2. 3. <i>Yersinia enterocolitica</i>	15
2. 2. 4. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	16
2. 3. Les outils de caractérisation des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme.....	17
2. 4. Expression du devenir des microorganismes indicateurs et pathogènes dans les engrais de ferme et dans le sol.....	20

2. 5.	Survie des microorganismes indicateurs et pathogènes dans le sol.....	22
2. 5. 1.	L'activité microbienne du sol.....	23
2. 5. 2.	Les conditions climatiques.....	24
2. 5. 3.	Les propriétés du sol.....	26
2. 6.	Procédés d'assainissement des lisiers.....	28
2. 6. 1.	L'entreposage.....	29
2. 6. 2.	La digestion aérobie.....	29
2. 6. 3.	La digestion anaérobie.....	30
2. 6. 4.	Variables influençant le pouvoir assainissant des procédés de traitement des lisiers.....	31
Chapitre 3	Fate of pathogenic and indicator microorganisms during storage of liquid hog manure in Québec.....	33
Chapitre 4	Persistence of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella</i> in surface soil following application of liquid hog manure for production of pickling cucumbers.....	53
Chapitre 5	Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries.....	77
Chapitre 6	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	98
Chapitre 7	CONCLUSIONS.....	110
	BIBLIOGRAPHIE.....	112

LISTE DES TABLEAUX

2. 1.	Sources de microorganismes pathogènes pour les fruits et légumes.....	8
2. 2.	Propriétés des principales méthodes de caractérisation des microorganismes.....	19
3. 1.	Reduction rates of <i>E. coli</i> populations in stored liquid hog manure under conditions typical of commercial swine production in Québec.....	49
3. 2.	Microbiological content of stored liquid hog manure under conditions typical of commercial swine production in Québec ...	50
4. 1.	Soil characteristics of the experimental fields for the production of pickling cucumber.....	71
4. 2.	Values of regression coefficients for the evaluation of <i>E. coli</i> decline in plots fertilized with liquid hog manure, assuming first-order kinetics.....	71
5. 1.	Description of volume and loading rates of swine slurries from various sources in different psychrophilic anaerobic digestion assays.....	93
5. 2.	Characteristics of swine slurries from different sources used to fill psychrophilic anaerobic digestors.....	94
5. 3a.	Indicator and pathogenic microorganisms content of raw manure samples.....	95
5. 3b.	Indicator and pathogenic microorganisms content of treated effluents.....	96

LISTE DES FIGURES

3. 1. <i>Escherichia coli</i> content and temperature of liquid hog manure from storages.....	52
4.1. Daily total precipitation and average low and high temperature for the second (Figure 1a) and third year (b) of experiment for the evaluation of <i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i> persistence in the production of pickling cucumber.....	72
4.2. <i>Escherichia coli</i> populations in the soil for treatments 115 LHM (figure 4.2a) and 80 LHM + 35 MF (Figure 4.2b) in the second year of the experiment; and for treatment 80 LHM + 35 MF on a sandy loam (Figure 4.2c) and on a loamy sand (figure 4.2d) in the third year of the experiment.....	74
4.3. Genetic profiles of <i>Salmonella</i> isolates (restriction enzyme <i>SpeI</i>) found in liquid hog manure and in soil after liquid hog manure spreading in the production of pickling cucumber.....	76
5.1. Schematic diagram of the laboratory scale bioreactors.....	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS

PFGE: Pulse field gel electrophoresis

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

MPPH: microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme

UFC: unités formatrices des colonies

g: gramme

kg: kilogramme

\log_{10} : logarithme décimal

ln: logarithme népérien

ha: hectare

REA: restriction enzyme analysis

T: tonne

ml: millilitre

TBG: tetrathionate brilliant green enrichment broth

μ l: microlitre

PCR: polymerase chain reaction

mM: millimole

ADN: acide désoxyribonucléique

COWP: *Cryptosporidium* oocyst wall protein

s: seconde

min: minute

N_t : nombre de bactéries au temps t

N_0 : nombre initial de bactéries

k: constante de décroissance microbienne

t: temps

m^3 : mètre cube

cm: centimètre

NB: nutrient broth

MACB: McConkey broth

LHM: liquid hog manure

NaCl: chlorure de sodium

EDTA: éthylène diamine tetra acetic acid

CaCl₂: chlorure de calcium

SBR: sequencing batch reactors

PAD: psychrophilic anaerobic digestion

COD: carbon organique dissout

VFA: volatil fatty acid

TCOD: total chemical oxygen demand

eeaA: gène de l'intimine

REMERCIEMENTS

Ce qui rend l'expérience du doctorat personnelle, ce sont les gens autour qui nous enseignent et nous encouragent. Je tiens à remercier tous ceux qui ont rendu cette période si enrichissante:

Mon directeur de recherche, Dr Sylvain Quessy, pour son ouverture d'esprit, sa générosité dans le partage de ses connaissances, son côté humain, sa flexibilité et la liberté qu'il m'a laissée.

Mon co-directeur, Dr Alain Villeneuve, pour ses conseils et sa collaboration.

Le laboratoire d'Hygiène Vétérinaire et Alimentaire de Saint-Hyacinthe et son équipe, particulièrement Louise Lessard et Louise Beausoleil, pour leur support technique.

Mes supérieurs actuels et antérieurs, Claude Bernard, Denis Cormier, Roch Joncas et Marc Laverdière pour m'avoir facilité la conciliation travail-études.

Les étudiants du Dr Quessy pour le plaisir de les avoir côtoyés pendant cette période, particulièrement ceux ayant participé à ce projet, dont Katline Guay.

Mes parents, pour leur confiance et leur amour inconditionnel.

Benoit, pour son support moral et ... informatique!

Ma petite Mélissa dont l'arrivée me comble de bonheur.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

De tout temps, les engrais organiques ont été utilisés afin de fertiliser différents types de cultures. Le défi de la valorisation des engrais de ferme sur les terres agricoles réside dans la gestion optimale de leur valeur fertilisante, tout en réduisant les impacts environnementaux découlant de leur usage. Plusieurs projets de recherche ont été menés au Québec et ailleurs dans le monde pour évaluer le potentiel fertilisant des engrais de ferme (Choudhary *et al.*, 1996), l'enrichissement des sols en éléments fertilisants (Tran *et al.*, 1996) et la qualité des sols résultant des épandages de fumiers (N'Dayegamiye et Côté., 1996). Toutefois, peu d'études ont été réalisées sur les aspects sanitaires liés aux pratiques d'épandages et l'intérêt porté envers ce secteur de recherche est plutôt récent (Mawdsley *et al.*, 1995).

Les engrais de ferme peuvent en effet contenir plusieurs types de microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme (MPPH) tels que *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* O157, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia* (Ostling et Lindgren, 1991). La présence possible de ceux-ci dans les champs cultivés représente un risque de contamination microbiologique des produits destinés à la consommation humaine et une source possible d'infection pour les animaux au pâturage (Nicholson *et al.*, 2002; Jack et Hepper, 1969). Des cas d'infections chez l'homme ont été documentés suite à la contamination directe ou indirecte de légumes par des fumiers (Chapman *et al.*, 1997a; Cieslak *et al.*, 1993; Guan et Holley, 2003).

Des normes ont été proposées à travers le monde dans le but de réduire le risque sanitaire associé aux épandages d'engrais de ferme. Ainsi, la Commission des Communautés Européennes (CCE) a proposé que le lisier soit entreposé pour un minimum de 60 jours avant son épandage sur les terres agricoles (Kelly, 1978), particulièrement en été avant l'utilisation dans les pâturages. Ce délai pré-épandage devrait, selon cet organisme, être

accru à 90 jours en conditions hivernales d'entreposage (CCE, 1981). Guan et Holley (2003) ont indiqué que l'entreposage de fumier de bovins (sans ajout de fumier frais au lot entreposé) pendant 90 jours à 25°C détruirait les principaux microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme pouvant s'y trouver.

Les recommandations reliées aux aspects sanitaires de la valorisation des fumiers peuvent aussi porter sur le délai à respecter entre l'épandage et la paissance ou la récolte des produits destinés à la consommation humaine. Jones (1980) propose que le lisier soit entreposé pendant un mois avant l'épandage sur les pâturages et suggère qu'un délai d'un mois soit par la suite respecté entre l'épandage des lisiers et l'accès au champ des animaux. Par ailleurs, le Conseil canadien de l'horticulture recommande que le délai entre l'épandage de fumier non-composté et la récolte des fruits et légumes soit d'au moins 120 jours.

La réduction des risques sanitaires reliés à l'utilisation des engrais de ferme nécessite une bonne connaissance du contenu microbiologique de ces derniers. De plus, il est nécessaire de connaître le potentiel de survie des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme introduits dans l'environnement lors des épandages.

Actuellement, au Québec et au Canada, peu de données scientifiques sont disponibles pour appuyer les recommandations proposées dans la littérature. De plus, on ne connaît pas quelle est la concentration minimale en microorganismes indicateurs et pathogènes des fumiers qui représente un risque réel pour l'environnement et la santé humaine et animale (Johnston *et al.*, 2003). On note un manque d'information quant à certains types d'engrais de ferme, particulièrement le lisier de porcs (Guan et Holley, 2003), et à la

dynamique des microorganismes (ex. survie dans le sol), particulièrement en conditions de terrain (Natvig *et al.*, 2002).

L'hypothèse de base à vérifier dans le cadre de cette étude était que: *L'épandage de lisier de porcs dans les cultures maraîchères représente un risque potentiel pour la santé humaine. Par conséquent, des mesures doivent être prises pour réduire ce risque.*

Pour y parvenir trois objectifs principaux ont été ciblés, soient: 1) préciser le contenu du lisier de porcs en microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme (MPPH); 2) déterminer le potentiel de survie des MPPH dans le sol et sur les légumes suite à l'épandage de lisier de porcs; 3) vérifier l'impact de procédures d'assainissement du lisier de porcs sur les MPPH. Il est à noter que, dans ce document, les populations de microorganismes peuvent être rapportées comme étant nulles (égales à zéro). Cela signifie qu'elles se situent en-dessous de la limite de détection de la méthode.

CHAPITRE 2

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2. 1. La contamination microbiologique des fruits et légumes

Une augmentation du nombre de cas d'infections reliés à la consommation de fruits et légumes a été observée en Amérique du nord au cours des vingt dernières années (Sewell et Farber, 2001; Tauxe *et al.*, 1997b). Celle-ci peut s'expliquer par certains changements dans les habitudes des consommateurs, la mise en marché des produits ainsi que par un système de surveillance accru des maladies entériques reliées à la consommation de ces produits (Sewell et Farber, 2001).

En effet, la population est de plus en plus sensibilisée à l'importance d'accroître les portions de fruits et légumes dans l'alimentation humaine. Après l'ascension du végétarisme au cours des années 70, l'alimentation à base d'aliments crus s'est révélée de plus en plus populaire (Sewell et Farber, 2001). Il en résulte une augmentation importante de la consommation des fruits et légumes depuis quelques années.

Cette demande croissante a entraîné des changements dans la production et la mise en marché des fruits et légumes. Une grande variété de produits est maintenant disponible à longueur d'année. Le développement de nouveaux modes de production et de conservation des aliments permet de mieux répondre à cette demande croissante. Certains de ceux-ci représentent toutefois certains désavantages quant à la salubrité des produits (Beuchat et Ryu, 1997). Par exemple, les emballages sous atmosphère contrôlé réduisent la prolifération des microorganismes responsables du déperissement des fruits et légumes, mais peuvent permettre la croissance de certains microorganismes potentiellement pathogènes pour l'humain (Sewell et Farber, 2001).

L'augmentation du nombre d'infections reliées à la consommation de fruits et légumes peut aussi être associée à une meilleure recension des cas (Sewell et Farber, 2001). Ainsi, certains microorganismes récemment identifiés sont de plus en plus fréquemment détectés (Tauxe, 1997b). L'augmentation de la sensibilité des méthodes de détection permet d'identifier des microorganismes présents en faible concentration. Il est aussi plus facile d'établir le lien entre les isolats alimentaires et cliniques grâce à la progression rapide des techniques de caractérisation des microorganismes (Sewell et Farber, 2001).

Une étude a été menée au Minnesota afin de déterminer les populations de coliformes fécaux ainsi que la prévalence de *E. coli*, *Salmonella* et *E. coli* O157:H7 sur plusieurs types de fruits et légumes (Mukherjee *et al.*, 2004). Les échantillons ont été prélevés à la ferme, dans des entreprises d'agriculture conventionnelle (129 échantillons) et biologique (476 échantillons) et ce, au moment de la récolte. La prévalence globale de *E. coli* sur les produits a été estimée à 1.6 % et 9.7 % chez les producteurs pratiquant l'agriculture conventionnelle et biologique respectivement. La présence de *Salmonella* a été observée sur deux échantillons provenant de fermes biologiques, alors que *E. coli* O157:H7 n'a été détectée sur aucun échantillon.

Beuchat et Ryu (1997) ont identifié les principales sources de microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme pouvant contaminer les fruits et légumes (Tableau 2.1). Pour les besoins de ce document, l'attention sera portée sur les contaminations pouvant survenir entre l'épandage des fumiers et la récolte des produits.

Tableau 2. 1. Sources de microorganismes pathogènes pour les fruits et légumes (tiré de Beuchat et Ryu, 1997)

Avant les récoltes	Après les récoltes
Matières fécales	Matières fécales
Sol	Manipulations
Eau d'irrigation	Équipements de récoltes
Eau pour traitements phytosanitaires	Contenants de transport
Fumier frais ou mal composté	Animaux sauvages et domestiques
Animaux sauvages et domestiques	Insectes
Insectes	Poussières
Manipulations	Eau de lavage
	Équipements de transformation
	Glace
	Véhicules de transport
	Mauvaises conditions d'entreposage

Le sol représente une source potentielle de microorganismes dont certaines souches peuvent être pathogènes pour l'homme. Par exemple, les spores de *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus* ainsi que *Listeria monocytogenes* sont fréquemment détectés dans les sols agricoles (Beuchat et Ryu, 1997). Leur présence sur les fruits et légumes est donc possible, surtout pour les produits poussant dans le sol. Les spores de clostridies sont d'ailleurs fréquemment isolées des feuilles des produits horticoles, particulièrement en été (Ercolani, 1997). Toutefois, *Listeria monocytogenes* est sûrement le microorganisme potentiellement pathogène pour l'homme le plus fréquemment trouvé dans le sol. Cette bactérie saprophyte vit sur les végétaux en décomposition et dans le sol (Weiss,

1975). Plusieurs souches de *Listeria monocytogenes* peuvent donc y être trouvées, dont certaines sont pathogènes pour l'homme (Welshimer, 1968).

Selon Beuchat et Ryu (1997), la présence de microorganismes pathogènes pour l'homme autres que *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp. et *Clostridium* dans le sol résulte principalement de l'application volontaire ou accidentelle de matières fécales. Les fumiers sont une source indéniable de microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme (Pell, 1997). Leur épandage représente un risque potentiel de contamination des produits frais. Les prochaines pages présenteront les principaux microorganismes indicateurs et pathogènes pour l'homme pouvant être trouvés dans les engrais de ferme. Une attention particulière sera portée sur ceux qui sont associés à la production porcine.

2. 2. Contenu des engrais de ferme en microorganismes pathogènes et indicateurs

Les engrais de ferme peuvent contenir plusieurs types de microorganismes pathogènes. Certains sont d'un intérêt particulier au Canada en ce qui a trait à la santé humaine, soient *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium* et *Giardia* (Guan et Holley, 2003). Selon le Comité de santé environnementale du Québec (2000), les principaux microorganismes pathogènes pouvant être présents dans les matières fécales des animaux d'élevage au Québec et transmissibles à l'homme par la voie environnementale incluent : *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia*.

Ces microorganismes peuvent infecter l'homme par le biais d'eau ou de cultures contaminées directement ou indirectement par des fumiers (Guan et Holley, 2003). La détection des microorganismes pathogènes étant fastidieuse et coûteuse, les indicateurs de contamination fécale sont généralement utilisés pour décrire la qualité microbiologique des échantillons alimentaires et environnementaux.

Les microorganismes indicateurs sont utilisés pour déterminer la présence possible d'agents pathogènes d'origine fécale. L'indicateur de contamination fécale le plus couramment utilisé est la présence des coliformes fécaux. Toutefois, il est maintenant reconnu que *E. coli* est un indicateur de contamination fécale plus fiable que les coliformes fécaux (Toranzos *et al.*, 2002). Cette bactérie a été fréquemment utilisée pour décrire le comportement des microorganismes d'origine fécale dans les sols et au cours de l'assainissement des engrais de ferme (Abdul et Loyd, 1985; Olsen, 1988).

2. 2. 1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille négatif à la coloration de Gram appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les isolats de *Escherichia coli* peuvent être caractérisés sérologiquement en se basant sur les antigènes O somatiques et les antigènes H flagellaires. Les souches d'*E. coli* sont très variables dans leurs propriétés biochimiques, mais les propriétés les plus communes sont une réaction positive au test d'indole et de 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), ainsi qu'une croissance à 44,5 °C. Toutefois, la souche d'*E. coli* O157:H7 est MUG⁻ et D-sorbitol⁻ (Farmer, 1999).

Escherichia coli est un habitant normal des intestins des mammifères à sang chaud. Cette bactérie est fréquemment utilisée comme indicateur de contamination fécale. Cependant, certains types peuvent causer la maladie chez l'homme. Quatre groupes d'*E. coli* ont été définis comme étant des pathogènes entériques : les souches entéropathogènes (EPEC), entérotoxigènes (ETEC), entéro-invasives (EIEC) et enfin entéro-hémorragiques (EHEC).

Le type entéro-hémorragique, produisant la vérocytotoxine, est le plus préoccupant en ce qui concerne la transmission zoonotique par voie environnementale (Comité de santé environnementale du Québec, 2000). Le sérotype le plus souvent mis en évidence est O157:H7. Toutefois, plus de 200 sérotypes autres que O157 ont été isolés chez l'homme (OMS, 1998). Les méthodes de détection couramment utilisées dans les laboratoires de diagnostic ne permettant pas de détecter les souches autres que O157, le nombre de cas associés aux souches autres que O157 est probablement sous-estimé (Bopp *et al.*, 1999).

La transmission d'*E. coli* entéro-hémorragique à l'homme peut se faire de personne à personne, ou par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Plusieurs types d'aliments peuvent être impliqués dans les infections, notamment le bœuf haché, les fruits et légumes et le lait. La dose infectante est faible, probablement moins de 100 organismes pour O157:H7 (Meng *et al.*, 2001). Après une période d'incubation de 3 à 4 jours, les souches d'*E. coli* entéro-hémorragiques peuvent causer chez l'homme des symptômes variés allant de diarrhées légères à intenses et sanguinolentes avec crampes abdominales sans fièvre (colite hémorragique). Il est aussi possible d'observer un syndrome hémolytique urémique chez environ 6% des patients atteints de diarrhées reliées à *E. coli* O157 (Bopp *et al.*, 1999). Les souches

entérohémorragiques de *E. coli* ont la particularité de tolérer les conditions acides, pouvant persister à des pH de 4.0 - 4.5 (Meng *et al.*, 2001).

Parmi les animaux d'élevage, les ruminants (particulièrement les bovins) sont considérés comme étant le principal réservoir de *E. coli* entérohémorragique (Meng et Doyle, 1998). Afin de préciser la prévalence de *E. coli* O157 chez les animaux d'élevage, une étude a été menée au Royaume-Uni (Chapman *et al.*, 1997b). Des échantillons de matières fécales de quelques espèces animales ont été prélevés peu de temps après l'abattage pendant une période d'un an. La détection a été faite par immunocapture et l'utilisation de la gélose MacConkey avec sorbitol (CT-SMAC). La prévalence de *E. coli* O:157 a été estimée chez les bovins à 15,7% (n=4 800). Chez le mouton et le porc, elle fut respectivement de 2,2% (n=1 000) et 0,4% (n=1 000). *E. coli* O:157 ne fut pas détecté dans les 1 000 échantillons de matières fécales de volaille. Des essais en culture cellulaire ont permis de constater que les isolats d'origine bovine et ovine étaient vérotoxino-gènes et possédaient le gène *eaeA*. Par contre, les souches porcines ne possédaient pas ces attributs.

Une autre étude a montré la présence de *Escherichia coli* O157:H7 dans les matières fécales de porcs prélevées à l'abattoir aux États-Unis (Feder *et al.*, 2003). Deux pourcent des échantillons furent positifs à cette bactérie (n=305). Deux pathotypes de *E. coli* O157 ont été identifiés dans cette étude, le premier possédant les gènes *eaeA*, *stx*₁ et *stx*₂ et le second possédant les gènes *eaeA*, *stx*₁ et *hly*₉₃₃ (hémolysine). À ce jour, en Amérique du Nord, aucune évidence n'a permis de relier des cas d'infection humaine à *E. coli* O157:H7 à des isolats d'origine porcine (Guan et Holley, 2003). Au Québec, certaines souches de *Escherichia coli* vérotoxino-gènes appartenant à d'autres sérotypes ont été identifiées chez le porc (Desrosiers

et al., 2001). D'autres études sont cependant requises pour préciser le risque réel de transmission du porc à l'homme.

Bien que peu d'évidences permettent de conclure au pouvoir pathogène des isolats de *E. coli* d'origine porcine pour l'homme, cette bactérie demeure un microorganisme indicateur de choix pour indiquer la présence possible d'autres microorganismes pathogènes dans l'environnement (Ogden *et al.*, 2001; Natvig *et al.*, 2004).

2. 2. 2. *Salmonella* spp.

Ce membre de la famille des *Enterobacteriaceae* est un bâtonnet mobile négatif à la coloration de Gram. Le genre *Salmonella* comprend 2 espèces, *S. enterica* et *S. bongori*. L'espèce *enterica* se subdivise en 6 sous-espèces: *S. enterica* ssp *enterica*, *S. enterica* ssp *salamae*, *S. enterica* ssp *arizonae*, *S. enterica* ssp *diarizonae*, *S. enterica* ssp *houtenae* et enfin *S. enterica* ssp *indica* (Bopp *et al.*, 1999).

On compte près de 2500 sérotypes dans le genre *Salmonella*, dont la plupart appartiennent à l'espèce *enterica* ssp *enterica*. Ce dernier groupe inclut les sérotypes Typhi et Paratyphi, rares en Amérique du nord, ainsi que Enteritidis et Typhimurium, fréquemment isolés en Amérique du nord. Les sérotypes Typhi et Paratyphi, responsables des fièvres typhoïdes, ont comme hôte unique l'homme et ne peuvent être donc être transmis de façon zoonotique (Shere *et al.*, 1998).

Après une période d'incubation de 8 à 72 heures, les souches de salmonelles non typhiques causent des gastro-entérites chez l'homme, caractérisées par des diarrhées, de la fièvre et des crampes abdominales,

ces signes cliniques pouvant persister une semaine ou plus (Bopp *et al.*, 1999; D'Aoust *et al.*, 2001). La dose infectante est faible, 1 à 10 cellules pouvant causer l'infection (D'Aoust *et al.*, 2001). L'infection est généralement d'origine alimentaire, les viandes, les produits du lait et le chocolat figurant parmi les aliments reliés à l'infection. Les fruits et légumes sont de plus en plus reconnus comme étant aussi un véhicule important de salmonellose humaine (D'Aoust *et al.*, 2001).

Salmonella peut être présent dans l'ensemble du cheptel agricole. Plusieurs études ont été menées dans le but de préciser la prévalence de cette bactérie chez différents animaux d'élevage. La majorité de ces études ont été faites à partir de matières fécales prélevées dans les abattoirs. Il est reconnu que le stress relié au transport contribue à accroître l'excrétion de *Salmonella* par les animaux (Ekperigin et Nagaraja, 1998). Il est donc possible que les concentrations trouvées dans les échantillons provenant des abattoirs soient supérieures à celles qui auraient été déterminées à partir des échantillons prélevés à la ferme. Au Canada, la prévalence de *Salmonella* dans les matières fécales de porcs prélevées dans les abattoirs a été estimée à 5,2% selon Letellier *et al.* (1999), alors qu'elle a été de 17,5% selon Lammerding *et al.* (1988). Elle a été estimée à 25% aux Pays-bas, 10% en Nouvelle-Zélande, 6% au Royaume-Uni et enfin 10-13% aux États-Unis (Ekperigin et Nagaraja, 1998). Davies *et al.* (1997) ont quant à eux observé une prévalence de 24,6% dans les matières fécales de porc en Caroline du nord. Chez les bovins et les ovins, le pourcentage d'infection a été estimé à 13-15% en Nouvelle-Zélande (Ekperigin et Nagaraja, 1998).

2. 2. 3. *Yersinia enterocolitica*

Les bactéries du genre *Yersinia* sont des bâtonnets négatifs à la coloration de Gram appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce genre comprend 10 espèces, dont trois sont potentiellement pathogènes pour l'homme : *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Les infections humaines causées par *Y. pestis* (agent responsable de la peste) et *Y. pseudotuberculosis* sont rares en Amérique du nord (Aleksic et Bockemuhl, 1999). Les sérotypes de *Y. enterocolitica* les plus fréquemment impliqués dans l'infection humaine sont O:3, O:5,27, O:8 et O:9 (Bottone, 1997).

Yersinia enterocolitica est principalement un pathogène gastro-intestinal. Il a toutefois une forte propension à causer des infections à d'autres organes. La yersiniose cause des douleurs au bas de l'abdomen qui peuvent être confondues avec une appendicite. Cette maladie se caractérise par une diarrhée liquide parfois sanguinolente accompagnée de fièvre, de vomissements et de crampes abdominales (Aleksic et Bockemuhl, 1999). Elle peut faire suite à la consommation de nourriture ou d'eau contaminée et rarement résulter d'une transmission de personne à personne. La période d'incubation est de 4 à 7 jours (Butler, 1994).

Parmi les animaux d'élevage, le porc serait le principal réservoir des sérotypes de *Yersinia enterocolitica* fréquemment impliqués dans l'infection humaine. Il a d'ailleurs été noté que le plus grand nombre de porcs infectés était retrouvé dans les pays où l'incidence humaine est élevée, tels que la Scandinavie, la Belgique, le Japon et le Canada (Acha et Szyfres, 1989).

Au Canada, la prévalence de *Yersinia enterocolitica* dans les matières fécales de porcs prélevées aux abattoirs a été estimée à 20,9% (Letellier *et al.*, 1999). Par ailleurs, dans une étude québécoise impliquant une vingtaine de fermes visitées un minimum de cinq fois, 80% des fermes présentaient au

moins un animal infecté à *Yersinia enterocolitica*. Parmi les isolats retrouvés, 93,5% appartenait au sérotype O:3, relié à l'infection chez l'homme (Pilon *et al.* 2000).

2. 2. 4. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium est un protozoaire appartenant à l'ordre des coccidies, phylum Apicomplexa. Onze espèces sont reconnues chez les vertébrés, basées sur les différences morphologiques, sur les techniques moléculaires, sur le site d'infection et sur la spécificité envers l'hôte. Ce sont *C. parvum*, *C. felis*, *C. canis*, *C. wrairi*, *C. andersoni*, *C. muris* chez les mammifères, *C. baileyi* et *C. meleagridis* chez les oiseaux, *C. serpentis* et *C. saurophilum* chez reptiles et enfin *C. nasorum* chez les poissons (Villeneuve, 2003). *Cryptosporidium parvum* est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infections chez l'homme et les mammifères (Rose, 1997).

La phase sexuée du cycle de vie du parasite conduit à la formation d'ookystes matures mesurant de 4 à 5 µm en diamètre qui sont éliminés dans les selles et sont infectieux dès l'excrétion. On a pu identifier 5 voies d'infection chez l'homme: ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, inhalation du parasite, contact avec une personne ou un animal infectés (Villeneuve, 2003). La dose infectante médiane est de 132 ookystes (DuPont *et al.*, 1995). Après une période d'incubation d'environ une semaine, le signe clinique le plus commun est une diarrhée profuse et liquide contenant souvent du mucus, mais rarement du sang. Celle-ci peut être accompagnée de crampes abdominales douloureuses, d'une fièvre peu marquée, de nausées et de vomissements (Villeneuve, 2003). Chez les personnes

immunodéprimées, l'infection peut s'étendre au pancréas, à la vésicule biliaire et même aux poumons (O'Donoghue, 1995).

Une étude québécoise a été menée afin d'évaluer la prévalence de *Cryptosporidium* spp. dans les fermes laitières du Québec. Un total de 505 fermes, réparties géographiquement sur l'ensemble du Québec, ont été échantillonnées, à raison de 5 veaux par ferme. L'étude a révélé que, dans 88,7% des fermes, on retrouvait au moins un veau excréteur *Cryptosporidium* spp. (Ruest *et al.* 1998). Par ailleurs, une étude canadienne a révélé une prévalence de 20% chez les bovins, 23% chez le mouton et 11% chez le porc (Olson *et al.* 1997).

2. 3. Les outils de caractérisation des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme.

L'identification des microorganismes au genre ou à l'espèce est généralement insuffisante pour caractériser des isolats dans le cadre d'études en épidémiologie moléculaire. Plusieurs méthodes permettent de caractériser des isolats de microorganismes d'une même espèce. Elles peuvent être classées en deux types, soient les approches phénotypiques et génotypiques.

Les méthodes de caractérisation phénotypique s'adressent aux différences pouvant être observées dans l'expression des gènes de différents isolats. Elles incluent notamment des techniques comme le biotypage, le sérotypage et le lysotypage (sensibilité aux phages). Les méthodes de caractérisation génotypique ciblent les différences au niveau du génome des isolats. L'électrophorèse à champs pulsés (PFGE), l'analyse des endonucléases de restriction, le ribotypage, le RAPD (*Randomly Amplified*

Polymorphic DNA), le RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) et le profil des plasmides figurent parmi les outils de caractérisation génotypique couramment utilisés en épidémiologie (Arbeit, 1999).

Le choix d'une méthode de caractérisation s'effectue selon différents critères, soient l'applicabilité de la technique à plusieurs souches, la reproductibilité, le pouvoir discriminant, ainsi que la facilité d'exécution et d'interprétation (Arbeit, 1999). Belkum *et al.* (2001) ont établi une liste des forces et faiblesses de différentes méthodes de caractérisation dont un extrait est présenté au tableau 2.2.

Tableau 2. 2. Propriétés des principales méthodes de caractérisation des microorganismes.

	Applicabilité	Reproductibilité	Pouvoir discriminant	Facilité d'exécution	Facilité d'interprétation	Disponibilité	Coût
Méthodes phénotypiques							
Antibiorésistance	**	**	*	***	***	***	Bas
Biotypage	**	*	*	***	***	***	Bas
Sérotypage	±	**	±	**	**	±	Moyen
Lysotypage	±	**	±	*	*	***	Moyen
Méthodes génotypiques							
REA (plasmides)	±	***	**	**	***	***	Moyen
REA (chromosomes)	***	±	±	**	**	±	Moyen
Ribotypage	***	***	**	**	**	±	Élevé
PFGE	***	***	***	**	**	±	Élevé
Séquençage	****	***	***	*	***	*	Élevé

* : faible; ** : bon; *** : excellent; **** : optimal; ± : variable

2. 4. Expression du devenir des microorganismes indicateurs et pathogènes dans les engrais de ferme et dans le sol

Les variations des populations de microorganismes indicateurs et pathogènes dans les engrais de ferme et dans le sol peuvent être décrites de plusieurs façons. Certains chercheurs effectuent des échantillonnages successifs de fumier, jusqu'à ce que les populations du microorganisme ciblé (inoculé expérimentalement ou naturellement présent dans le fumier / lisier) atteignent des niveaux non-détectables (Ajariyakhajorn *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 2003; Kudva *et al.*, 1998). La même démarche peut être faite dans le sol suite à l'ajout d'engrais de ferme ou l'inoculation avec des microorganismes indicateurs ou pathogènes (Baloda *et al.*, 2001; Tannock et Smith, 1972). Le potentiel de survie des microorganismes dans les fumiers ou dans le sol sera alors exprimé en nombre de jours requis pour que les populations atteignent des niveaux non-détectables. Bien que cette approche apporte des informations importantes sur le potentiel de survie des microorganismes, elle est influencée par la quantité initiale de microorganismes. En effet, plus celle-ci est grande au début de l'expérience, plus le délai nécessaire à la disparition des microorganismes sera grand (Strauch et Ballarini, 1994). Il est donc difficile de comparer le potentiel de survie de différents microorganismes ou encore des résultats expérimentaux provenant de sources différentes lorsque la concentration microbienne initiale diffère. C'est pourquoi certains auteurs utilisent d'autres approches, soient le délai de réduction décimale (temps requis pour que les populations soient réduites de 90%).

L'observation des données de la littérature a permis de constater que les populations de microorganismes entériques suivent généralement une décroissance exponentielle dans les fumiers et dans le sol. Une relation

linéaire existe donc entre le logarithme des populations microbiennes et le temps. Cette relation fut exprimée par la loi de Chick, représentée par l'équation suivante:

$$N_t / N_0 = 10^{-kt} \text{ (équation 1), où:}$$

N_t = nombre de microorganismes au temps t

N_0 = nombre de microorganismes au temps 0

t = temps (jours)

k = constante de décroissance microbienne

L'équation 1 peut aussi être présentée sous la forme:

$$\log_{10} (N_t / N_0) = -k t \text{ (équation 2),}$$

ou encore:

$$\ln (N_t / N_0) = -k^* t \text{ (équation 3), si le logarithme naturel est utilisé.}$$

Dans la littérature scientifique, il est parfois difficile de savoir si le logarithme naturel ou en base 10 a été utilisé, ce qui complique la comparaison des résultats de différentes sources. Lorsque la base de calcul est connue, il est toutefois possible de faire la conversion si nécessaire. Ainsi, la constante k définie en base e peut être convertie en base 10 en la multipliant par 0,4343 (Crane et Moore, 1986).

Reddy *et al.* (1981) ont proposé des ajouts à la loi de Chick, afin de tenir compte des principaux paramètres influençant la décroissance des populations de microorganismes dans le sol, soient la température, l'humidité

et le pH. Crane et Moore (1986) ont répertorié plusieurs approches de complexité variable proposées dans la littérature pour décrire le comportement des microorganismes. Toutefois, l'utilisation de la loi de Chick apparaît pour ces derniers la plus avantageuse. En effet, peu de données sont disponibles pour valider les autres modèles en ce qui a trait au taux de décroissance des microorganismes dans les sols. De plus, la loi de Chick est simple d'utilisation et la comparaison des résultats provenant d'études différentes est facile (Crane et Moore, 1986).

2. 5. Survie des microorganismes indicateurs et pathogènes dans le sol

Plusieurs épidémies d'origine hydrique et alimentaire associées aux engrais de ferme sont documentées dans la littérature (Guan et Holley, 2003). Comparativement aux autres types d'engrais de ferme, le fumier de bovin a été impliqué plus souvent dans ces épidémies (Guan et Holley, 2003). C'est pourquoi la communauté scientifique s'est particulièrement intéressée à ce type d'engrais de ferme dans les études visant la dynamique des microorganismes pathogènes dans l'environnement. L'attention s'est donc dirigée vers les microorganismes retrouvés chez les bovins, surtout lorsque ceux-ci représentent un risque important pour la santé humaine. À titre d'exemple, notons *Escherichia coli* O157:H7.

La survie des microorganismes indicateurs et pathogènes dans les sols est influencée par une multitude de variables dont il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats. Parmi ceux-ci, notons l'activité microbienne du sol, la température, l'humidité, le pH, la texture et le contenu en matière organique du sol, ainsi que la radiation solaire (Reddy *et al.*, 1981; Cools *et al.*, 2001).

L'impact de ces variables sur la persistance des microorganismes indicateurs et pathogènes dans le sol a pu être observé dans le cadre d'études menées en laboratoire, suite à l'ajout au sol de souches bactériennes de laboratoire ou encore de microorganismes provenant du fumier. L'ajout de souches contrôles de laboratoire marquées représente un avantage technique considérable puisque le suivi et la détection en sont facilités. Toutefois, l'utilisation de ces dernières ne reflète pas toujours le comportement des isolats pouvant être trouvés dans les fumiers dont la composition et la diversité génétique diffèrent (Topp *et al.*, 2003).

2. 5. 1. L'activité microbienne du sol

Les microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme introduits dans le sol sont soumis à une compétition microbienne (particulièrement pour les éléments nutritifs) et à une prédation par les protozoaires. L'importance de l'activité microbienne du sol sur la persistance des microorganismes entériques a été démontrée dans plusieurs expérimentations menées en laboratoire.

Ainsi, les populations d'une souche contrôle de *E. coli* demeurèrent stables suite à l'inoculation d'un loam limoneux préalablement stérilisé par autoclavage et maintenu à 4, 20 et 37°C et ce, pendant 100 jours suivant l'inoculation. Par contre, la survie de cette bactérie dans les sols non-autoclavés fut de 100 jours ou moins, selon la température (Bogosonian *et al.*, 1996).

Une autre expérience menée en laboratoire par Jiang *et al.* (2002) a démontré la persistance supérieure de *E. coli* O157:H7 dans les sols stériles. Différentes doses de fumier de bovin préalablement inoculé avec cette

bactérie furent ajoutées à des échantillons de sol maintenus à des températures de 5, 15 et 21°C. Une croissance bactérienne fut observée dans quelques traitements impliquant les sols autoclavés quelques jours après l'ajout du fumier, ce qui ne fut pas le cas dans les sols non-autoclavés. Le taux de décroissance bactérienne fut supérieur dans les sols non-autoclavés.

Le même phénomène fut observé par Turpin *et al.* (1993) pour *Salmonella* suite à l'ajout d'une souche contrôle dans un sol autoclavé comparativement à un sol non-autoclavé. La dose de *Salmonella* était de 2×10^8 UFC/g et les échantillons ont été maintenus à 22°C. Au cours des 38 jours suivant l'inoculation, une diminution de près d'une unité logarithmique fut observée dans le sol stérilisé, alors qu'elle fut de plus de 5 unités logarithmiques dans le sol non-autoclavé.

2. 5. 2. Les conditions climatiques

De façon générale, une augmentation de la température et une diminution de l'humidité entraînent une réduction de la survie des microorganismes indicateurs et pathogènes.

Ainsi, l'inoculation de microcosmes de sol avec une souche contrôle de *E. coli* a permis de démontrer la persistance de cette bactérie en fonction de la température (Bogosonian *et al.*, 1996). Elle fut d'environ 100 jours à 4°C, 65 jours à 20°C et 12 jours à 37°C, le contenu initial du sol suite à l'inoculation étant de 2.1×10^7 UFC/g de sol. Selon Zibilske et Weaver (1978), la persistance de *Salmonella enterica* Typhimurium dans le sol fut estimée à 42 jours à 22 °C et 63 jours à 5 °C.

Cools *et al.* (2001) ont observé la persistance de *E. coli* en fonction de la température et de l'humidité dans un loam ayant reçu une dose de lisier de porcs équivalente à 410 tonnes / ha (210 g de lisier dans 2 kg de sol). Les échantillons de sol, dont le contenu initial en *E. coli* était de 2×10^6 UFC/g, furent incubés à des températures de 5, 15 et 25° C et maintenus à des conditions d'humidité différentes, soit 60, 80 et 100% de la capacité au champ. Dans tous les cas, la persistance de *E. coli* fut supérieure avec une diminution de la température et une augmentation du contenu en humidité. Ainsi, à une température de 5° C combinée à une capacité au champ de 100%, les populations bactériennes atteignirent la limite de détection au jour 80, alors que la limite de détection fut atteinte en 38 jours avec une température de 25° C et un contenu en humidité de 60% de la capacité au champ. La survie supérieure de *Streptococcus faecalis* lors d'une augmentation du contenu en humidité du sol fut aussi démontrée par Kibbey *et al.* (1978) et ce, à différentes températures.

La persistance accrue des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'humain dans les sols à basse température peut s'expliquer par une diminution de l'activité des microorganismes du sol, qui entraîne une diminution de la compétition avec la flore du sol et une diminution de la prédation par les protozoaires (Cools *et al.*, 2001; Curds, 1993; Trevisan *et al.*, 2001).

Après une analyse des données disponibles dans la littérature, Reddy *et al.* (1981) ont estimé la constante de décroissance (telle que définie par la loi de Chick) de différents types de microorganismes indicateurs et pathogènes dans l'environnement (sol et eau). La moyenne fut de 1.14 jour^{-1} pour les coliformes fécaux ($0.08\text{-}9.1 \text{ jour}^{-1}$) et de 1.33 jour^{-1} pour *Salmonella* ($0.21\text{-}6.93 \text{ jour}^{-1}$).

Selon les mêmes auteurs, la constante double avec une augmentation de température de 10° C dans la gamme de température variant de 5 à 30° C. De plus, elle augmente avec une diminution du contenu en humidité. Les auteurs ont proposé une équation permettant d'ajuster le coefficient de décroissance microbienne en fonction de la température et de l'humidité.

Bien que la plupart des auteurs affirment qu'une élévation de température entraîne une diminution de la survie des microorganismes indicateurs et pathogènes, Jiang *et al.* (2002) ont observé le phénomène contraire. Du fumier de bovin préalablement inoculé avec *E. coli* O157:H7 a été ajouté à des échantillons de sol en laboratoire dans un ratio fumier:sol de 1:10, 1:25, 1:50 et 1:100. Le seuil de détection fut atteint en 63 jours ou moins à 5 °C, 165 jours ou moins à 15 °C et 231 jours ou moins à 21 °C.

2. 5. 3. Les propriétés du sol

Le pH, la texture et le contenu en matière organique figurent parmi les variables les plus importantes qui influencent la survie des microorganismes indicateurs et pathogènes dans le sol (Crane et Moore, 1986).

De façon générale, les valeurs extrêmes de pH (élevées ou basses) contribuent à réduire la survie des microorganismes pathogènes (Crane et Moore, 1986).

Cools *et al.* (2001) ont publié une des rares études ayant porté sur l'impact de la texture du sol sur la survie de *E. coli*. Des échantillons de sol de texture différente (loam, sable loameux et sable) auxquels ont été ajoutés du lisier de porcs à une dose équivalente à 410 T/ha (12 g de lisier dans 114 g de sol) ont été incubés à 5° C et 25° C pour une période de 1 à 68 jours.

Indépendamment de la température et de la date d'échantillonnage, la survie bactérienne fut significativement supérieure dans le sable, comparativement au loam et au sable loameux. Le même phénomène fut observé dans une étude menée en laboratoire et au champ par Trevisan *et al.* (2002). En laboratoire, suite à l'ajout d'une dose de 20 T/ha de lisier contenant 10^5 et 10^8 UFC/g, le taux de mortalité des coliformes fécaux fut de 0.11 j^{-1} dans les sols argileux et de 0.075 j^{-1} dans les sols sableux. Au champ, dans des prairies ayant reçu des doses de 20-40 T/ha de lisier, le taux de décroissance des coliformes fécaux dans le sol fut estimé à $0.05-0.20 \text{ jour}^{-1}$ dans les sols sableux et à $0.17-0.30 \text{ jour}^{-1}$ dans les sols argileux.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la persistance accrue des MPPH dans les sols légers, comparativement aux sols lourds. Celle-ci pourrait être due à une activité inférieure des protozoaires dans les sols légers, reliée aux conditions souvent moins humides dans ce type de sol, ce qui réduirait la prédation exercée envers les bactéries fécales (Trevisan, 2002).

Certains auteurs maintiennent toutefois que les sols argileux contribuent à une plus grande survie des bactéries dans le sol (Wessendorf et Lingens, 1989). La présence d'argile favoriserait la création d'agrégats dans le sol, riches en humidité et en éléments nutritifs, ce qui offrirait une meilleure protection contre la prédation par les protozoaires (Cools *et al.*, 2001).

La présence de matière organique permettrait aussi la création de micro-habitats riches en éléments nutritifs favorables à la survie bactérienne (Yates et Yates, 1988). Mallmann et Litsky (1951) ainsi que Dazzo *et al.* (1973) ont démontré que l'augmentation du contenu en matière organique du

sol favorise la survie des microorganismes d'origine fécale. Les observations de Tate (1978) ont permis de constater que la survie de *E. coli* était trois fois plus grande dans un sol organique que dans un sol sableux.

Il est nécessaire de tenir compte de l'ensemble des propriétés du sol pour estimer le potentiel de survie des MPPH. Par exemple, selon Cools *et al.* (2001), la persistance accrue de *E. coli* dans le sable, comparativement au loam et au sable loameux utilisés dans leur étude, s'expliquerait par le fait que le sable avait un contenu supérieur en matière organique.

Certains cas d'infection humaine ont été causés par une contamination directe ou indirecte des fruits et légumes par des engrais de ferme (Chapman *et al.*, 1997a; Cieslak *et al.*, 1993). À titre d'exemple, notons l'épidémie de listériose survenue en Nouvelle-Écosse au début des années 80. L'enquête révéla que du chou fut contaminé suite à l'épandage de fumier de mouton utilisé pour fertiliser la culture. Celui-ci contenait la bactérie *Listeria monocytogenes*. Cette épidémie impliqua 41 personnes et causa 17 mortalités (Schlech *et al.*, 1983).

2. 6. Procédés d'assainissement des lisiers

Les fumiers peuvent donc contenir des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme. Ces derniers peuvent survivre dans le sol pour une durée variable dépendant des conditions présentes. Il est possible de réduire le risque pour la santé humaine et animale en abaissant le contenu en microorganismes pathogènes du fumier ou du lisier avant son épandage. À cet effet, plusieurs stratégies d'assainissement peuvent être envisagées. Dans les prochaines pages, l'attention sera portée

sur certaines approches qui peuvent s'appliquer au lisier, soient l'entreposage ainsi que la digestion aérobie et anaérobie.

2. 6. 1. L'entreposage

L'entreposage des lisiers contribue à réduire les populations de microorganismes pathogènes qui s'y trouvent, particulièrement lorsqu'il n'y a pas d'ajout continu de lisier frais dans le lot entreposé (Nicholson *et al.*, 2002). Le pouvoir assainissant de l'entreposage peut être évalué par la mesure des populations de microorganismes indicateurs et/ou de microorganismes pathogènes spécifiques des lisiers.

Selon Jones *et al.* (1977), la population de *Salmonella* dans le lisier de bovins est passée de 10^6 à des niveaux non-détectables après 74 jours à 10°C (sans apport de lisier frais). Une décroissance exponentielle des bactéries indicatrices (*E. coli* et streptocoques fécaux) ainsi que des microorganismes pathogènes tels que *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica* fut observée par Munch *et al.* (1987) au cours de l'entreposage. La persistance de ces microorganismes fut supérieure à basse température ($6-9^{\circ}\text{C}$) comparativement à haute température ($18-20^{\circ}\text{C}$).

2. 6. 2. La digestion aérobie

De façon générale, comparativement à l'entreposage seul, le traitement biologique des lisiers (digestion aérobie ou anaérobie) entraînera une disparition plus rapide des microorganismes indicateurs et pathogènes. Ainsi, les populations de ces derniers furent réduites par l'aération comparativement au simple entreposage, tant à basse ($6-9^{\circ}\text{C}$) qu'à haute température ($18-20^{\circ}\text{C}$) (Munch *et al.*, 1987). La digestion aérobie s'est aussi

avérée efficace pour détruire *Salmonella* dans le lisier de porcs et de bovins, tant à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle de la ferme (Heinonen-Tanski *et al.*, 1998). L'aération a permis de réduire les populations initiales de *Salmonella* de 99% ou plus en 2 à 5 semaines. Selon Ginnivan *et al.* (1981) la digestion aérobie thermophile du lisier de porcs a permis de faire passer les populations de *Salmonella* de 10^6 à des niveaux non-détectables en 4 heures.

2. 6. 3. La digestion anaérobie

La digestion anaérobie permet aussi, comparativement au simple entreposage, de réduire la persistance des microorganismes indicateurs et pathogènes. Kearny *et al.* (1993a) ont étudié le délai requis pour qu'une réduction de 90% des populations de microorganismes (T_{90}) du lisier de bovins soit observée et ce, en conditions expérimentales. Au cours de l'entreposage, le T_{90} de *E. coli*, *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica* fut respectivement de plus de 29 jours, 21,3 et 20,8 jours à une température de 4°C. Par contre, à 17°C, il fut de plus de 29 jours, 17,5 et 12,8 jours pour ces mêmes bactéries respectivement. Dans la même étude, le T_{90} fut réduit à 0,8, 0,9 et 0,7 jours pour *E. coli*, *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica* respectivement suite à une digestion anaérobie mésophile (35°C) séquentielle. En alimentation semi-continue du bioréacteur, la survie de *E. coli*, *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica* était supérieure, le T_{90} atteignant 1,5, 1,1 et 2,5 jours respectivement. Selon une autre étude menée par les mêmes chercheurs (Kearny *et al.*, 1993b), la persistance des microorganismes était nettement supérieure à l'échelle de la ferme. Le T_{90} de *E. coli*, *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica* s'élevait alors à 76,9, 34,5 et 18,2 jours respectivement.

2. 6. 4. Variables influençant le pouvoir assainissant des procédés de traitement des lisiers

Plusieurs variables affectent le pouvoir assainissant des technologies de traitement des lisiers. Parmi celles-ci, notons le temps de rétention, le pH, la température, le contenu en solides ainsi que la production d'acides gras volatils.

Dans une étude menée en laboratoire, la survie de *Salmonella* dans le lisier de bovins s'est montrée affectée par la quantité initiale de microorganismes, la température, le contenu en solides et la souche de *Salmonella* présente (Jones *et al.*, 1977). La persistance de cette bactérie fut supérieure lorsque le contenu en solides excédait 5% et que la température était inférieure à 10°C. Par ailleurs, une relation fut observée entre la diminution du pH et la disparition de *Salmonella*. Selon les auteurs, l'impact du pH sur *Salmonella* ne serait pas direct, mais résulterait plutôt de la production de composés acides toxiques pour *Salmonella* produits durant le stockage par les autres microorganismes présents naturellement dans le lisier.

Une augmentation du temps de rétention permettra d'obtenir des niveaux plus élevés d'assainissement (Olsen, 1988). De la même manière, une augmentation de la température aura un effet assainissant supérieur au cours de l'entreposage (Munch *et al.*, 1987), de la digestion aérobie (Munch *et al.*, 1987) et de la digestion anaérobie (Kumar *et al.*, 1999; Olsen et Larsen, 1987). Il a aussi été démontré qu'une augmentation du contenu en solides de 9 à 15% entraînait une augmentation de la persistance de *Salmonella* (Kumar *et al.*, 1999). Au cours de la digestion anaérobie du lisier, une corrélation fut

observée entre la population de *Salmonella* et la concentration en acides gras volatils du lisier ainsi qu'une diminution du pH (Tappouni, 1984).

Il est aussi important de tenir compte des conditions expérimentales dans l'analyse de la littérature. À titre d'exemple, la survie de microorganismes indicateurs soumis à une digestion anaérobie mésophile s'est montrée plus longue dans une étude menée à l'échelle de la ferme, comparativement aux essais menés en laboratoire où des souches de microorganismes avaient été artificiellement ajoutées (Kearny *et al.*, 1993b).

Par contre, dans une autre étude portant sur la digestion aérobie, aucune différence n'a été constatée entre les études menées à l'échelle du laboratoire ou de la ferme (Heinonen-Tanski *et al.*, 1998). L'efficacité des procédés de traitement diffère aussi en fonction du type de microorganisme. En digestion anaérobie mésophile, le T_{90} de *Streptococcus faecalis* fut de 15 jours, comparativement à 10 jours pour *E. coli* et *Salmonella* (Kumar *et al.*, 1999). Par ailleurs, alors que le T_{90} de *E. coli*, *Salmonella* et *Streptococcus faecalis* était respectivement de 0,4, 0,7 et 1 heure au cours d'une digestion anaérobie à 53 °C, les spores de *Clostridium perfringens* ne furent pas affectées (Olsen et Larsen, 1987).

L'analyse de la littérature témoigne du manque de données qui permettrait de faire une analyse du risque relié aux épandages d'engrais de ferme dans les cultures maraîchères. Cette lacune est particulièrement évidente en ce qui a trait à l'utilisation du lisier de porcs. Les prochaines pages présenteront trois études qui ont été menées dans le but de mieux connaître le comportement des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme dans le lisier de porcs et dans le sol, dans une optique de salubrité des légumes fertilisés avec cet intrant.

CHAPITRE 3

FATE OF PATHOGENIC AND INDICATOR MICROORGANISMS DURING STORAGE OF LIQUID HOG MANURE IN QUÉBEC

**Manuscript accepté pour publication dans *Livestock Production
Science* (sous presse)**

**Fate of pathogenic and indicator microorganisms during storage of
liquid hog manure in Québec**

**Caroline Côté ¹, Alain Villeneuve ², Louise Lessard ³ and
Sylvain Quessy ²**

¹ Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, 3300
Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7B8.

² Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, 3200
Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

³ Agence canadienne d'inspection des aliments, 3400 boul. Casavant ouest,
Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 8E3.

RÉSUMÉ

Les microorganismes pathogènes des fumiers représentent un risque potentiel pour la santé humaine et animale. Peu de données décrivant le contenu microbiologique du lisier de porcs destiné à l'épandage sont disponibles dans la littérature scientifique. L'objectif de cette étude était de vérifier la présence et estimer la persistance de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. dans le lisier de porcs provenant de fosses d'entreposage sous des conditions typiques de la production commerciale du porc au Québec. Le contenu en *E. coli* du lisier de porcs échantillonné lors de la période d'épandage variait entre 0 et 5.52 log CFU/g. avec un intervalle de confiance au niveau 95% de 3.16 à 4.23 log CFU/g. *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. ont été détectés dans 37, 9 et 3 % des échantillons respectivement. Dans les conditions de cette étude, le nombre de jours prédit pour obtenir une diminution de 90% des populations de *E. coli* variait entre 15 et 26 jours, alors que la durée prédite pour atteindre des niveaux non-détectables fut estimée à 54 à 114 jours. La persistance maximale de *Salmonella* spp. observée au cours de cette étude fut de 88 jours. Un délai d'entreposage de 73 jours fut insuffisant pour éliminer *Yersinia enterocolitica*.

Mots-clés: lisier de porcs, survie de microorganismes pathogènes, entreposage.

ABSTRACT

Pathogenic microorganisms in manure represents a potential hazard to human and animal. Few data describing the microbiological content of liquid hog manure intended for spreading are available in the scientific literature. The objective of this study was to verify the presence and estimate the persistence of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. in liquid hog manure from storages under conditions typical of commercial swine production in Québec. *E. coli* content of liquid hog manure taken during the spreading period in the 32 hog operations varied between 0 and 5.52 log₁₀ CFU/g with a 95% confidence interval of 3.16-4.23 log₁₀ CFU/g. *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. were detected in 37, 9 and 3 percent samples respectively. Under the conditions of this experiment, the predicted number of days required to obtain a 90% reduction of *E. coli* populations varied between 15-26 days, while the predicted storage period necessary to reach undetectable levels was 54-114 days. The maximal persistence of *Salmonella* observed in this study was 88 days. A 73 days storage time was insufficient for the elimination of *Yersinia enterocolitica*.

Keywords: liquid hog manure, pathogens survival, storage.

INTRODUCTION

The presence of pathogenic microorganisms in liquid hog manure sprayed on land represents a potential health hazard to humans and grazing animals. The Commission of the European Communities (CEC) stated that manure should be stored for a minimum of 60 days before spraying on land (Kelly, 1978), especially in the summer on grazing land, and stored a minimum of 90 days in winter before land application (CEC, 1981). Jones (1980) recommended that manure be stored for one month, followed by a one-month waiting period after manure spreading during which pasture should not be grazed in order to reduce the risk of spreading *Salmonella* via slurry. According to Guan and Holley (2003), holding manure at 25°C for 90 days will render it free from major pathogens. Some authors stated that in field conditions, T_{90} values (the delay required to obtain a 90% reduction of microorganisms) may be used to predict the storage time required to obtain an acceptable reduction of bacterial counts during the batch storage of farm slurry prior to spraying it on land (Kearny *et al.*, 1993; Munch *et al.*, 1987). The greater the number of microorganisms present in slurry at the beginning of storage period the longer will be the time to reach undetectable levels (Strauch and Ballarini, 1994).

The decline of pathogenic and indicator microorganisms in stored liquid manure is highly influenced by the temperature, the die-off rate being higher at high temperature (15-37 °C) than at low temperature (4-10 °C) (Ajariyakitajorn *et al.*, 1997; Kearny *et al.*, 1993; Munch *et al.*, 1987). Therefore, local meteorological conditions must be taken into account if one wants to evaluate the fate of microorganisms during storage in a particular geographical area.

There are very few data concerning the indicator and pathogenic microorganisms content of liquid hog manure in outdoor storage structures in

Québec. Also, no data is available concerning the decline of those microorganisms under the climatic conditions encountered in this province. *E. coli* is an efficient fecal contamination indicator in the environment (Toranzos *et al.*, 2002). It has been consistently used to evaluate the fate of indicator and pathogenic microorganisms in stored manure and the decontaminating effect of slurry treatment (Munch *et al.*, 1987; Himathongkham *et al.*, 1999).

The objective of this project was to verify the presence and evaluate the survival of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. in liquid hog manure from storages under conditions typical of commercial swine production in Québec.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Liquid hog manure samples were obtained from a convenient sampling of 32 finishing hog operations located in the Lanaudière and Montérégie regions of Québec. In each tank, nine slurry samples were taken directly in storage structures at three different places and at three depths at each sampling site (bottom, middle, and surface of the tank). Those 9 samples were mixed to form a composite sample representing each tank. One mixed sample was analyzed from each farm. Temperature and pH of the composite sample were recorded. Sampling was done in spring and fall, during spreading period. The number of sampled farms was 14 in spring (April 30th-May 15th) and 18 in autumn (August 28th-September 27th). Storage tanks sampled in the spring represented the liquid hog manure produced in the farm in the previous 7-9 months, while samples taken in September represented the manure from the previous 3-4 months. Tanks in spring were different from those in autumn.

Also, liquid hog manure samples were taken once a week in six additional closed outdoor storage structures on commercial farms located in the same geographical area in order to evaluate the impact of storage on indicator and pathogenic microorganisms. No fresh manure was added to those tanks during sampling period. Temperature and pH of the composite samples were recorded. Sampling began on mid-April and lasted for 5 to 9 weeks. Tanks 1, 2, 3 and 4 did not receive fresh manure from April 14th, while the feeding of tanks 5 and 6 stopped respectively on march 3 and march 17. The sampling period was as follow: april 14 to June 25 in tanks 1, 5 and 6; April 14 to June 16 in tank 2; and April 22 to May 19 in tanks 3 and 4. Therefore, sampling began a few hours after last addition of fresh manure in tanks 1 and 2. The delay between last addition of fresh manure and the beginning of sampling was 8 days in tanks 3 and 4, 42 days in tank 5 and 28 days in tank 6.

Sampling instruments were changed or washed and disinfected with 70% ethanol between each tank to avoid cross contamination. All samples were transported to the laboratory at 4°C and analyzed within 48 h following collection.

Microbiological analysis. *E. coli* quantification was done by the use of Petrifilm *E. coli* / coliforms Count Plate (3M Microbiology Products, St. Paul, Minn.) according to manufacturer's instructions with serial phosphate-buffered saline dilutions. Each sample was analyzed in one replicate with 6 dilutions (10^{-1} to 10^{-6}). After 48 h of incubation, typical colonies were considered as *E. coli*.

Salmonella was detected by incubating 25 g of the samples in 225 ml of nutrient broth (Difco laboratories, Detroit, Mich.) overnight at 37°C. Following this pre-enrichment step, one ml of nutrient broth was incubated into 9 ml of Tetrathionate Brilliant Green broth (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md) overnight at 37°C. One loopful of the TBG culture was inoculated onto a Brilliant Green Sulfa agar (Difco) containing 20 µg/ml of novobiocine (Sigma chemicals Co., St. Louis, Mo.) and incubated for 24 to 48 hours at 37°C. Typical colonies were tested biochemically (triple sugar iron and Christensen's urea media hydrolysis) and identification was confirmed by API processing (Biomerieux, Ville St-Laurent, Quebec).

Recovery of *Y. enterocolitica* was done by a cold enrichment technique. One gram of sample was put in 9 ml of phosphate-buffered saline and kept at 4°C for three weeks. Samples were inoculated on *Yersinia* agar base (cefsulodin-irgasan-novobiocin agar, Oxoid) and incubated at 28°C for 24 to 48 h in an aerobic atmosphere. Typical colonies were inoculated on triple sugar iron and Christensen's urea media (Difco) and incubated at 28°C

for presumptive identification. Isolates were further biochemically analyzed using the API 20E (BioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo).

The presence of *Cryptosporidium* was verified using microscopic observation (Price, 1994) and PCR. For the detection by PCR, 10 g of sample were diluted with 40 ml of dispersing solution (50 mM Tris, 0.5% Tween 80), mixed at 150 rpm 15 minutes and incubated in ultrasonic bath (Branson, Dandury, USA) for 15 minutes. The mix was filtered on sterile gauze. Oocysts in the filtrate were concentrated by immunocapture using commercial Dynabeads (Dynal, Oslo, Norway) according to manufacturer's instructions. DNA from purified oocysts was released by five cycles of freezing-thawing followed by proteinase K digestion in 50 mM Tris 1mM EDTA pH 8 containing 0.2% SDS. Total genomic DNA was extracted using the DNeasy tissue kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) according to manufacturer's instructions. COWP (*Cryptosporidium* oocyst wall protein) gene was amplified in standard PCR reaction containing 2.5 units of Hotstart*Taq* DNA polymerase and 30 pmoles of CRY-15 (5'-GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3') and CRY-9 (5'-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3') primers (Invitrogene, Burlington, Ontario, Canada). The PCR reaction was carried out in a thermocycler Uno II (Biometra). The templates were subjected to one cycle of 15 minutes at 95°C and 30 amplification cycles (94°C for 50 s; 55°C for 30 s; 72°C for 50 s) followed by one cycle of 10 min at 72°C. Each amplification reaction included a negative control, which contained all reagents except target DNA, and a positive control (purified *Cryptosporidium parvum* oocysts from Waterborne inc., New Orleans, LA). Amplified DNA products were resolved by conventional electrophoresis through horizontal 1.5% agarose gels at 100 V. The results were visualized over a UV transilluminator.

Statistical analyses. Confidence interval at 95% level was established for the *E coli* content (log CFU/g) of liquid hog manure. When the bacterium

was not detected, a value of 1.0 CFU/g was assigned for calculation of the confidence interval.

Comparisons were made between the microbiological content of liquid hog manure sampled in spring and autumn. Statistically significant differences ($P < 0.05$) were established by subjecting data to a one-way analysis of variance (ANOVA) with SAS System © software.

E. coli die-off in stored liquid hog manure was described assuming first-order kinetics (Crane and Moore, 1986). Die-off rate was calculated from:

$$\ln (N_t / N_0) = -kt$$

Where:

N_t = *E. coli* content at time t (CFU g^{-1} of soil)

N_0 = *E. coli* content at time 0 (CFU g^{-1} of soil)

k = first-order or die-off rate constant

t = time (days)

which can also be expressed in the form:

$$\ln N_t = -kt + \ln N_0$$

Linear regression was carried out using the microsoft Excel 97 statistical function.

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological content of liquid hog manure. *E. coli* content of liquid hog manure taken during the spreading period in the 32 hog operations varied between < 1 and $5.52 \log_{10}$ CFU/g with a 95% confidence interval of 3.16 - $4.23 \log_{10}$ CFU/g. *Salmonella* was detected in 12 out of 32 (37.5%) samples of liquid hog manure, of which 6 were found positive in samples taken in spring ($n=14$) and 6 in fall ($n=18$). Three samples of liquid hog manure were positive to *Y. enterocolitica* (two samples taken in spring and one taken in winter) and *Cryptosporidium* spp. was detected in only one sample. The *E. coli*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica* and *Cryptosporidium* content of liquid hog manure did not significantly differ between spring and autumn samples.

Impact of storage on *E. coli* and *Salmonella*. Temperature of liquid hog manure in the six closed slurry tanks varied between 3 and 9°C during the mid-April to mid-May period. It reached 11 to 16°C from mid-May to the end of June. The range of pH of stored liquid hog manure was between 7.5 and 8.0 during the experimental period.

The initial *E. coli* concentrations in tanks 1, 2, 3, and 4 were respectively 4.5 , 4.6 , 3.2 , and $2.9 \log_{10}$ CFU/g. Regression analysis indicates a first order inactivation rate, resulting in a linear relationship between time and $\ln E. coli$ populations in tanks 1-4. The regression equations, the associated R^2 values and the derived T_{90} and $T_{99.99}$ (time required for 90 and 99.99% reduction of *E. coli* populations) are presented in table 3.1. Under the conditions of this experiment, the predicted number of days required to obtain a 90% reduction of *E. coli* populations varied between 15-26 days, while the predicted storage period necessary to reach undetectable levels was 54-114 days. It was not possible to calculate T_{90} and $T_{99.99}$ in tanks 5 and 6 due to the initial low *E. coli* counts observed in those tanks. Those low counts can be

related to the fact that those 2 tanks did not receive fresh manure since march, compared to tanks 1-4 where the feeding stopped in april. In tank 5, *E. coli* counts were below the detection limit of 10 CFU/g from may 27th (after 88 days of storage), while undetectable levels of *E. coli* were observed at each sampling date (28 days and more of storage) in tank 6.

The maximal persistence of *Salmonella* observed during the experiment was 88 days in tank 5 (Table 3.2a). *Salmonella* was still detected after the storage time of 35 days in tanks 3 and 4 (Figure 3.1). *Y. enterocolitica* was intermittently detected in liquid swine manure storages (Figure 3.1 and Table 3.2), probably because low levels of this bacteria were present in stored manure. Nevertheless, results showed that a 72 (Figure 3.1a) and 73 days (Table 3.2a) storage period was insufficient for non detection of *Y. enterocolitica*. It was not possible to evaluate the persistence of *Cryptosporidium* during storage because this parasite was not detected in the six closed tanks.

The objective of this project was to verify the presence and evaluate the survival of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Cryptosporidium* spp. in liquid hog manure from storages under conditions typical of commercial swine production in Québec. We were particularly interested in studying the fate of *E. coli* as an indicator microorganism to evaluate the persistence of pathogenic enterobacteria.

E. coli counts in liquid hog manure were highly variable and this fact influenced the delay required to reach undetectable levels of this indicator bacteria during storage. Under the conditions of our experiment, 15-26 days were necessary to achieve a 90% reduction of *E. coli* populations in stored liquid hog manure at ambient temperature (temperature of slurry of 3-16°C). Munch *et al.* (1987) obtained a longer T₉₀ of 37 days for *E. coli* in pig slurry,

which could be explained by slightly colder average temperatures of 6-9°C during their study.

Estimated die-off rate (k) of *E. coli* in stored liquid hog manure varied between 0.0896 and 0.1549 in the study reported here. Krieger *et al.* (1976) obtained a value of 0.277 for fecal coliforms survival in swine lagoon effluent. Two variables could have lead to a faster die-off in this last experiment compared to our results. First, the range of temperature was higher (23-28°C). Also, persistence of fecal coliforms and *E.coli* could be different since *E. coli* is only one genus of the several genus that compose fecal coliforms.

It was not possible from data of tanks 3 and 4 to estimate the non detection time for *Salmonella*, most probably because storage duration was too short. The maximal persistence of *Salmonella* observed in our study was 88 days (tank 5). This is consistent with results obtained in laboratory experiments. Jones (1976) found that *Salmonella* dublin survived in cattle slurry for 132 days at 5 and 10°C, and for 57 days at 20°C. Ajariyakhajorn *et al.* (1997) observed that *Salmonella* anatum survived in swine slurry for 56 days at 4°C.

In this study, *Cryptosporidium* was detected in only 1 out of 32 samples. This is lower than the percentage observed by Flemming *et al.* (1997), where twenty swine farrowing operations were visited three times. Analysis showed that 75% of the swine farms with liquid manure storages tested positive at least once. It could be interesting in the future to compare the prevalence of *Cryptosporidium* in different operations since the study reported here was done in growing-finishing hog operation.

CONCLUSION

This research demonstrated that indicator and pathogenic microorganisms can be present in liquid swine manure storages during spreading period under conditions typical of commercial swine production in Québec. A one month batch storage of liquid swine manure was sufficient to obtain an important reduction (90%) of *E. coli* populations prior to spraying it on land. However, this storage time was too short to provide the elimination of *Salmonella* and *Y. enterocolitica*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was financially supported by the Livestock environmental initiative and the Fédération des producteurs de porcs du Québec. The technical assistance of Louise Beausoleil was greatly appreciated. The authors also want to thank Katline Guay, Mylène Généreux, Karen St-Pierre, and Joanie Bousquet for their precious support in collecting and analyzing the samples.

REFERENCES

- Ajariyakhajorn, C., S. M. Goyal, R. A. Robinson, L. J. Johnston, and C. A. Clanton. 1997. The survival of *Salmonella* anatum, pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine slurry. *Microbiologica*. 20: 265-369.
- CEC, 1981. Communicable diseases resulting from storage, handling, transport, and land spreading of manures. Walton, J. R. and E. G. White (ed). Commission of the European Communities. Luxembourg: Office of Publications of the European Community.
- Crane, S. R. and J. A. Moore. 1986. Modeling enteric bacterial die-off: a review. *Water Air Soil Poll.* 27: 411-439.
- Flemming, R., J. McLellon, D. Alves, D. Hilborn, K. Pintar and M. MacAlpine. 1997. *Cryptosporidium* in livestock, manure storages, and surface water in Ontario. Final report. 53 p.
- Guan, T. Y. and R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness-a review. *J. Env. Qual.* 32: 383-392.
- Himathongkham, S., S. Bahari, H. Riemann and D. Cliver. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol. Lett.* 178: 251-257.
- Jones, P. W. 1980. Health hazards associated with the handling of animal wastes. *Vet. Rec.* 106 : 4-7.

Jones, P. W. 1976. The effect of temperature, solids content and pH on the survival of salmonellas in cattle slurry. *Brit. Vet. J.* 132: 284-296.

Kearny, T. E., M. J. Larkin and P. N. Levett. 1993. The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 86-93.

Kelly, W. R. 1978. Animal and human health hazards associated with the utilization of animal effluents. EUR 6009 EN. Brussels: Commission of the European Communities.

Krieger, D. J., J. H. Bond and C. L. Barth. 1976. In *Managing livestock wastes*, Proc. 3rd Int. Symp. On livestock wastes. ASAE Pub. Proc.-275, St. Joseph, MI. p. 11.

Munch, B., H. E. Larsen and B. Aalbaek. 1987. Experimental studies on the survival of pathogenic and indicator bacteria in aerated and non-aerated cattle and pig slurry. *Biol. Wastes.* 22: 49-65.

Price, D. L. 1994. Procedure manual for the diagnosis of intestinal parasites. Boca Raton, Florida: CRC Press: 65-70.

Strauch, D. and G. Ballarini. 1994. Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. *J. Vet. Med.* 41: 176-228.

Toranzos, G. A., G. A. Mcfeters and J. J. Borrego. 2002. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. p. 205-219. *In* *Manual of environmental microbiology*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C.

TABLES

Table 3.1. Reduction rates of *E. coli* populations in stored liquid hog manure under conditions typical of commercial swine production in Québec (regression of the ln survivors on storage time).

Tank	Regression equation	R ²	T ₉₀ (days)	T _{99.99} (days)
1	$\ln_t = -0.0982 t + 10.88$	0.9617	23	110
2	$\ln_t = -0.0896 t + 10.23$	0.8001	26	114
3	$\ln_t = -0.1062 t + 8.59$	0.8909	22	81
4	$\ln_t = -0.1549 t + 8.41$	0.8739	15	54

* T₉₀ = time required for 90% reduction of *E. coli* populations

* T_{99.99} = time required for 99.99% reduction of *E. coli* populations

Table 3.2 a. Microbiological content of stored liquid hog manure under conditions typical of commercial swine production in Québec (tank 5).

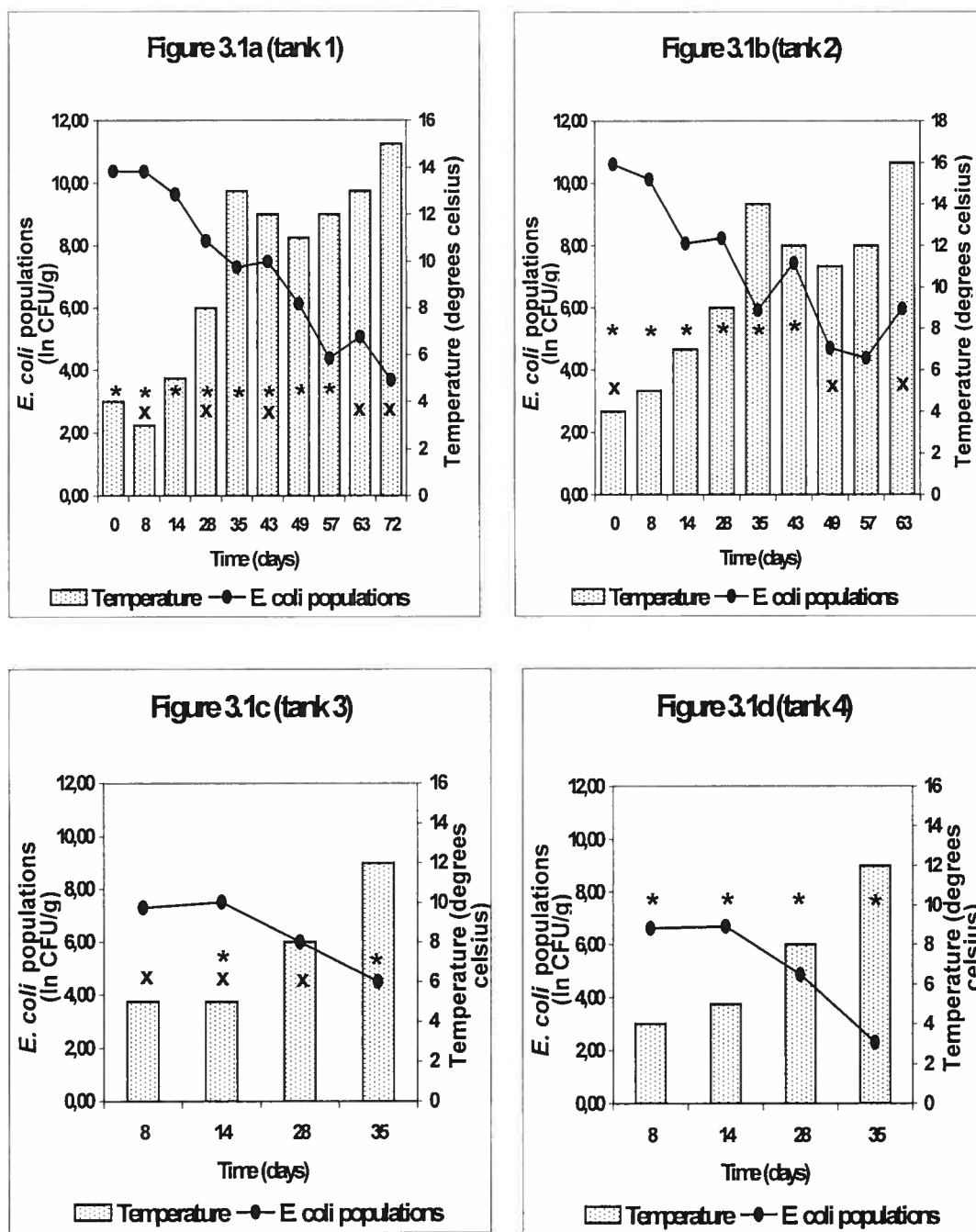
Date	Storage time (days)	<i>E. coli</i> (CFU / g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>
14 / 04	42	30	+	-
22 / 04	50	< 10	+	-
28 / 04	56	20	+	-
12 / 05	73	< 10	-	+
19 / 05	80	10	-	-
27 / 05	88	< 10	+	-
02 / 06	94	< 10	-	-
10 / 06	102	< 10	-	-
16 / 06	108	< 10	-	-
25 / 06	117	< 10	-	-

Table 3.2 b. Microbiological content of stored liquid hog manure under conditions typical of commercial swine production in Québec . (tank 6)

Date	Storage time (days)	<i>E. coli</i> (CFU / g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>
14 / 04	28	< 10	+	-
22 / 04	36	< 10	+	-
28 / 04	42	< 10	+	-
12 / 05	56	< 10	+	-
19 / 05	63	< 10	-	-
27 / 05	71	< 10	-	-
02 / 06	77	< 10	-	-
10 / 06	85	< 10	-	-
16 / 06	91	< 10	-	-
25 / 06	100	< 10	-	-

FIGURE

Figure 3.1. *Escherichia coli* content and temperature of liquid hog manure from storages. * *Salmonella* - positive sample ; ^x *Yersinia enterocolitica* - positive sample.



CHAPITRE 4

PERSISTENCE OF *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA* IN SURFACE SOIL FOLLOWING APPLICATION OF LIQUID HOG MANURE FOR PRODUCTION OF PICKLING CUCUMBERS

**Manuscript publié dans *Journal of Food Protection*
2005, 68: 900-905**

Persistence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in surface soil following application of liquid hog manure for production of pickling cucumbers

Caroline Côté ^{1*} and Sylvain Quessy ²

¹ Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, 3300 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7B8.

³ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

* Corresponding author. Tel.: 450-778-6522; Fax: 450-778-6539; [REDACTED]
[REDACTED]

RÉSUMÉ

Le lisier de porcs est couramment épandu au sol comme fertilisant des cultures. Toutefois, cette pratique soulève des inquiétudes concernant la salubrité des aliments, particulièrement lorsque le lisier est utilisé dans des cultures de fruits et légumes. Les objectifs de ce projet étaient d'évaluer la persistance de *E. coli* et *Salmonella* spp. dans le sol de surface suite à l'application de lisier de porcs dans la culture du cornichon et de vérifier la qualité microbiologique des produits récoltés. Les engrais minéraux ont été remplacés par le lisier de porcs à différentes proportions pour la production du cornichon dans une étude au champ de trois ans. Le dispositif expérimental était en blocs complets aléatoires et comprenait quatre répétitions sur un loam sableux (années 1, 2, et 3) et un sable loameux (année 3). Des échantillons de sol ont été prélevés à une profondeur de 20 cm à toutes les deux semaines après l'application des fertilisants organiques et inorganiques au mois de juin. Des échantillons de légumes ont également été prélevés au moment des récoltes. Les échantillons de lisier de porcs, de sol et de légumes (préalablement lavés ou non) ont été analysés pour vérifier la présence de *E. coli* et *Salmonella*. Une décroissance exponentielle des populations de *E. coli* fut observée dans le sol de surface suite à l'application du lisier. Le délai moyen estimé pour atteindre des niveaux non-détectables de *E. coli* dans le sol a été estimé à 56 à 70 jours dans le loam sableux, alors qu'il a été évalué à 77 jours dans le sable loameux. La persistance maximale de *Salmonella* spp. dans le sol fut de 54 jours. *E. coli* et *Salmonella* spp. n'ont pas été détectés dans les échantillons de légumes.

Mots-clés: lisier de porcs, légumes, salubrité, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

ABSTRACT

Liquid hog manure is routinely applied to the land as a crop fertilizer. However, this practice raises food safety concerns, especially when manure is used on fruit and vegetable crops. The objectives of this project were to evaluate the persistence of *E. coli* and *Salmonella* in surface soil after applying liquid hog manure on pickling cucumbers fields and to verify the microbiological quality of harvested products. Mineral fertilizers were replaced by liquid hog manure at various ratios in the production of pickling cucumbers in a three year field study. The experimental design was a randomized complete block comprising four repetitions on a sandy loam (years 1, 2 and 3) and on a loamy sand (year 3). Soil samples were taken at a depth of 20 cm at every two weeks after a June application of organic and inorganic fertilizers. Vegetable samples were also taken at harvest time. Liquid hog manure, soil and vegetable (washed and unwashed) samples were analyzed to detect *Salmonella* and *Escherichia coli*. An exponential decrease of *Escherichia coli* populations was observed in surface soil after the application of manure. The estimated average time required to reach undetectable levels of *E. coli* in sandy loam varied from 56 to 70 days while the absence of *E. coli* was estimated at 77 days in loamy sand. The maximal *Salmonella* persistence in soil was 54 days. *E. coli* and *Salmonella* were not detected in any vegetables samples.

Mots-clés: liquid hog manure, vegetables, salubrity, *Escherichia coli*, *Salmonella*.

INTRODUCTION

Land application is an economic means to dispose of liquid hog manure and to recycle plant nutrients. This practice has been shown to increase yields of cereals, legumes, oilseeds, pastures and vegetables (Choudhary *et al.*, 1996). However, it raises questions concerning food safety.

In Canada, human illness outbreaks associated with the consumption of contaminated fruits and vegetables have been reported in the past few years (Sewell and Farber, 2001). Some outbreaks or infections have been associated with the direct or indirect contamination of the product with animal manure (Chapman *et al.*, 1997; Cieslak *et al.*, 1993). There is thus a need to obtain data on the persistence of pathogens in manure-fertilized soils to better evaluate the risk of vegetable contamination.

The survival of indicator and pathogenic microorganisms in the soil and sediments has been the subject of many laboratory experiments using microcosms (Bogosonian *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2002; Lejeune *et al.*, 2001). These studies provided some understanding of survival mechanisms, but the results are difficult to extrapolate to field conditions. Natvig *et al.* (2002) used beds of bovine manure-fertilized soils maintained in controlled environmental chambers to evaluate *Salmonella* and *Escherichia coli* survival in soil after bovine manure application as well as contamination of vegetables. Field experiments were also conducted in order to verify, for example, the persistence of *Salmonella* on pasture (Findlay, 1972) and hay meadow (Trevisan *et al.*, 2002). However, little data is available to estimate survival of pathogens and indicator microorganisms in vegetable production systems under field conditions.

The aims of this project were to evaluate the persistence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in surface soil under field conditions in the

production of pickling cucumbers and to evaluate vegetable microbiological contamination after the application of liquid hog manure.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of the experimental site. The experiment was conducted at an experimental farm located at l'Assomption, 40 km from Montreal (Québec). Soil pH of the experimental area was determined on 1:1 soil water suspension. Organic carbon was extracted by the Walkley Black wet oxidation technique and available phosphorus and potassium by the mehlich III-extractable elements technique. Soil characteristics are described in Table 4.1. The daily total precipitation and average high and low temperatures for the second and third years of the experiment are presented in Figure 4.1.

Experimental design. Mineral fertilizers (MF) were replaced by liquid hog manure (LHM) at different ratios for the production of pickling cucumbers (*Cucumis sativus* L., Pik Rite). Four fertilization methods were evaluated in 1998 and 1999 on a sandy loam. In treatments 115 MF and 115 LHM, all the nitrogen (115 kg/ha) was applied before seedlings. In treatment 115 MF, nitrogen was applied as mineral fertilizers. In treatment 115 LHM, it was applied as liquid hog manure. In treatments 3 and 4, nitrogen was applied in two ways. Eighty kg/ha were applied before seedlings, as MF in treatment 85 MF + 30 MF, and as LHM in treatment 85 LHM + 30 MF. In both these treatments, 30 kg/ha were applied at mid-growth as MF.

In 2000, only treatments 85 MF + 30 MF and 85 LHM + 30 MF were evaluated. This was done on two sites, a sandy loam and a loamy sand. Fertilizers were applied according to soil analysis and followed the recommendations of the Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec (CRAAQ, 2003). The quantity of LHM applied

was based on its nitrogen content and on crop requirements. The quantity of LHM needed to provide 115 kg/ha of nitrogen was 94 m³/ha in 1998, and 37 m³/ha in 1999. In 1998, 1999, and 2000, the quantity of LHM applied was respectively 65, 25, and 27 m³/ha to provide a level of 80 kg/ha of nitrogen. Phosphorus and potassium fertilization was adjusted to complement levels provided by the LHM.

Organic and inorganic fertilizers were spread and incorporated at 20 cm in the soil on June 9th, 17th, and 14th in the first, second and third year of the experiment respectively. Seedlings were done on June 22nd, 18th, and 15th respectively for years 1, 2, and 3. Harvest extended from the beginning of August to mid September. The experimental design was a randomized complete block with four repetitions. The distance between repetitions was 10 m and each plot was separated by 1 m. Plots were 4 m wide (4 rows) and 10 m long. Plants were seeded 10 cm apart on the row, in rows 1 m apart. Fertilizers were applied at mid June and seedlings were done a few days later. Harvest extended from the beginning of August to mid September.

Sampling. LHM sampling was done by taking four 250-ml samples at various times during spreading. These were mixed to form a composite sample.

Composite samples composed of ten soil samples randomly taken from each plot at a depth of 0-20 cm were taken at five different periods: before spreading and at 2, 4, 6 and 8 weeks after spreading. Sampling instruments were washed and disinfected with 70% ethanol and plastic boots were changed between each plot.

During harvest period, 2 samples of 20 cucumbers were taken in each plot with sterile gloves for microbiological analysis. All samples were kept at 4°C until the analysis, which was done less than 24 hours after sampling. One

of the two samples was not washed before analysis. The other was washed with sterile distilled water prior to analysis. Cucumbers were aseptically cut in approximately 1 g pieces and mixed to form a composite sample for bacteriological analysis.

Microbiological analysis. *Escherichia coli* quantification was done according to manufacturer's instructions by the use of Petrifilm E. coli / coliforms count plate (3M Microbiology Products, St. Paul, Minn.) with serial phosphate-buffered saline dilutions. After 48 h of incubation, typical colonies were counted as *Escherichia coli*.

An enrichment procedure was performed with 10-gram samples incubated in 90 ml of Nutrient broth (NB) (Difco Laboratories, Sparks, Md.) overnight at 37°C. One ml of the NB culture was added to 9 ml of MacConkey broth (MACB) (BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) and incubated overnight at 37°C. Ten µl of the MACB culture were plated on MacConkey agar (Difco laboratories) and incubated overnight at 37°C.

Salmonella was detected by incubating 25 g of the samples in 225 ml of nutrient broth (Difco laboratories) overnight at 37°C. Following this pre-enrichment step, 1 ml of nutrient broth was transferred into 9 ml of Tetrathionate Brilliant Green broth (BBL) and incubated overnight at 37°C. One loopful of the TBG culture was then inoculated onto a Brilliant Green Sulfa agar (Difco laboratories) containing 20 µg/ml of novobiocin (Sigma chemicals Co., St. Louis, Mo.) and incubated for 24 to 48 hours at 37°C.

Presumptive *E. coli* and *Salmonella* identification was confirmed by further biochemical testing. The tests used were as follows: urea hydrolysis, Simmons citrate, and triple sugar iron. Isolates not showing a characteristic

profile were further biochemically analyzed using the API 20E (BioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo).

To verify the genetic link between strains of *Salmonella* found in LHM samples and soil, genetic characterization was done by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using a protocol based on the method of Kaufmann and Pitt (1994). Pure overnight cultures grown on blood agar were suspended in 75 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 7.5) to an optical density of 1.5 at 625 nm. Then, 500 μ l of this suspension was mixed with 500 μ l of 1.5% low-gelling temperature agarose (Sigma) dissolved in sodium chloride -EDTA. The mixture was kept at 56°C until it was put in the molds. After 10 min at 4°C, the solidified plugs were transferred into 3.6 ml of 1% (wt/vol) N-lauryl sarcosine, 0.5 M EDTA (pH 9.5) (lysis buffer). To this mixture, 0.4 ml of a 10 mg/ml solution of proteinase-K (Sigma) in 50 mM Tris, 1 mM CaCl₂ (pH 8) was added. Cell lysis was carried out for 20 h at 56°C in a water bath. On the following day, the plugs were washed with 10 mM Tris, 10 mM EDTA (pH 7.5) and stored in this buffer. Before digestion of bacterial DNA, plugs were pre-electrophoresed to improve the clarity of restriction patterns. Agarose-embedded DNA was digested with 20 U of restriction endonuclease XbaI. Isolates showing no difference in their genetic profiles were submitted to another DNA digestion with 20 U of SpeI. Digestion was carried out at 37°C for 24 hours. PFGE was performed using the Gene Navigator system (Amersham pharmacia biotech) in a 1,2% high-gelling agarose (Sigma), Tris, borate, EDTA 0.5X buffer gel in accordance with the manufacturer's instructions. The gel was run for 20 hours at 10°C at a constant voltage of 200 volts, using pulse times of 5 to 25 s with linear ramping and an electrical field angle of 120°. The gels were stained with ethidium bromide, destained in distilled water, and photographed on type 667 Polaroid instant sheet film apparatus under UV illumination. Two lambda ladder PFGE markers (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) were used on each gel.

Data analysis. *E. coli* die-off in the soil after liquid hog manure spreading was described assuming first-order kinetics (Crane and Moore, 1972; Reddy *et al.*, 1981). Die-off rate was calculated using the following equation:

$$\log_{10} (N_t / N_0) = -k t \text{ (Eq. 1)}$$

Where:

N_t = the *E. coli* content (CFU/g of soil) at time t

N_0 = the initial *E. coli* content after LHM application (CFU/g of soil)

k = first-order coefficient for the net die-off rate of *Escherichia coli* (days^{-1})

t = time (days)

Least squares linear regression analysis was performed using SAS System © software. Rate constant k on base 10 logarithm form can be converted to natural logarithm form by dividing k by 0.4343 (Crane and Moore, 1985).

RESULTS

Microbiological content of LHM. The *E. coli* content of the LHM applied in the first year of the experiment was too low to be counted by direct plating on petrifilms and bacteria were recovered only after enrichment procedures. In the second and third years, 5.43 and 6.11 log₁₀ CFU/g were respectively recovered. *Salmonella* was detected only in LHM used in the last year of experiment.

Escherichia coli. During the first year of the experiment, *E. coli* and *Salmonella* were not detected in soil samples taken before the application of organic and inorganic fertilizers and at 2, 4, 6, and 8 weeks after spreading.

In the second and third years, *E. coli* was not detected in soil before the application of organic and inorganic fertilizers. A linear decrease of log *E. coli* populations was observed in the soil after LHM application ($R^2 = 0.90 - 0.99$ in the sandy loam, and 0.82 in the loamy sand) (Figure 4.2). After the application of LHM containing 5.43 log CFU/g (year 2, sandy loam), the average *E. coli* soil content at harvest time (around 8 weeks after spreading) was 1.87 and 1.70 log₁₀ CFU/g in treatments 115 LHM and 80 LHM + 35 MF respectively. The *E. coli* content of LHM used on year 3 was 6.11 log CFU/g. At harvest time, the average *E. coli* soil content was 1.87 log CFU/g in the sandy loam and 2.12 log CFU/g in the loamy sand.

Field data were used to estimate first-order die-off rate of *E. coli* in the surface soil. Those results allowed us to predict the number of days required to reach 0 levels of *E. coli* in the soil under the conditions of our experiment. Estimated determination coefficient (R^2), initial *E. coli* content (N_0), die-off rate (k), predicted number of days required to obtain *E. coli* populations equal to zero, and respective confidence intervals ($\alpha = 0.10$) are presented in Table 4.2. Estimated k value ranged from 0.049 to 0.063 d⁻¹ in the sandy loam and

was 0.038 d^{-1} in the loamy sand. The predicted number of days required to reach 0 *E. coli* in the soil varied from 56 to 70 in the sandy loam and was estimated at 77 days in the loamy sand. Inevitable field variations lead to relatively large confidence intervals.

E. coli was detected in two plots which had received only mineral fertilizers in the last year of the experiment. One instance was in the loamy sand 14 days after fertilization (repetition 2; 50 CFU/g), and the other in the sandy loam 27 days after spreading (repetition 2; 200 CFU/g). Undetectable levels were observed in all other plots which had received only mineral fertilizers (treatments 115 MF and 80 MF + 35 MF).

Salmonella. All samples of LHM, soil and vegetables were free of *Salmonella* in the first two years of the experiment. In the third year, this bacterium was detected in liquid hog manure and in soil samples.

In the sandy loam, *Salmonella* was detected in the soil 14 days after application of LHM (3 repetitions out of 4) and 27 days after application (2 repetitions out of 4). The bacterium was also found in the loamy sand 14, 27, 40, and 54 days after application but not in all repetitions (Figure 4.3). One additional sample was taken in the plot that was found positive to *Salmonella* at day 54 after application, but the bacteria was not recovered 68 days after application. Surprisingly, *Salmonella* was found in two plots that received only mineral fertilizers (treatment 80 MF + 35 MF) in the loamy sand 14 days after fertilization (second repetition), and in the sandy loam 27 days after fertilization (second repetition). However, it should be underlined that *E. coli* was also detected in the same samples. *Salmonella* was not detected on any vegetable sample.

Digestion with *Xba*I and *Spe*I restriction enzymes revealed identical PFGE profiles for the isolates of *Salmonella* found in LHM and manure-

fertilized soil samples (Figure 4.3). Also, all isolates belonged to the serotype *Salmonella* Infantis. *Salmonella* profiles found in inorganic-fertilized plots were the same as those in LHM.

DISCUSSION

E. coli and *Salmonella* were not detected on pickling cucumbers after the June application of LHM under the conditions of this experiment. However, those bacteria have been found in the soil at harvest time (2 months after application) in some repetitions. Even if *E. coli* and *Salmonella* were not detected on products, their presence in the soil at harvest time represents a potential hazard since soil particles can contaminate products.

E. coli populations in soil were reduced by more than 2.5 log and 1.78 log CFU/g within eight weeks after LHM spreading in the sandy loam and the loamy sand respectively. Experimental results are difficult to compare with other studies because of the variability of the experimental conditions among published experiments (type of soil or manure, inoculum, laboratory or field experiment). According to Natvig *et al.* (2002), decrease of *E. coli* in soil beds was less pronounced after the application of bovine manure in a loamy sand in June. In their experiment, the *E. coli* soil content dropped from 5 log CFU/g to 3.4 log CFU/g within eight weeks. It is likely that factors such as humidity and soil microbial activity affected results and explained the higher persistence of *E. coli* in soil beds.

Estimated k value ranged from 0.063 to 0.049 d⁻¹ in the sandy loam and it was 0.038 d⁻¹ in the loamy sand. According to Trevisan *et al.* (2002), the fecal bacteria decay was estimated at 0,075 in a silty sand under controlled conditions, which is slightly faster than our results.

The average predicted number of days required to reach undetectable levels of *E. coli* in the soil varied from 56 to 70 in the sandy loam and was estimated at 77 days in the loamy sand. Values in the same order of magnitude have been reported in the literature in laboratory experiments. For example, *Escherichia coli* K-12 strain added to the soil rapidly declined from 9.5 log CFU/g to undetectable levels in 65 days at 20°C (Bogosonian *et al.*, 1996). Cools *et al.* (2001) demonstrated that *E. coli* can survive in soil which has received fresh pig manure containing 2×10^6 CFU/g over periods of 68-80 days.

It is interesting to note that using the same treatment (80 LHM + 35 MF) and similar soil type (sandy loam), a faster *E. coli* decline was observed in year 3 ($k=0.063$) compared to year 2 ($k=0.056$). The average delay required to *E. coli* extinction was then lower in year 3, even though the *E. coli* content of applied LHM was higher. Those results could be explained by climatic conditions encountered during the experiment. In the last year of the experiment, cumulative precipitation for the June-September period was 286 mm, while it was 405 mm in the second year of the experiment (Figures 1b and 1c). It is recognized that moisture is a major factor determining bacterial survival. Greater survival is often associated with moist soils and rainfall is a factor that favors *E. coli* survival (Cools *et al.*, 2001; Guan and Holley, 2003).

Salmonella was also still present in one plot at the beginning of harvest time in the last year of the experiment, with a maximal persistence of 54 days in the loamy sand and 27 days in the sandy loam. In two experiments conducted in soil beds, *Salmonella* persistence was estimated at 6 (Tannock and Smith, 1972) and 14 weeks (Natvig *et al.*, 2002) after the application of inoculated sheep and bovine manure respectively. In a field experiment, *Salmonella* was isolated up to 14 days in agricultural surface soils after the spreading of contaminated pig slurry (crop not specified) (Baloda *et al.*, 2001).

Salmonella was found in two plots that received only mineral fertilizers. It should be noted that experimental fields were not accessible to humans during the investigation and that precautions were taken to avoid soils cross contamination during the sampling period. However, small mammals and birds had access to fields during the experiment and could have transported microorganisms from one plot to another.

Pickling cucumbers were selected in this experiment because they are a fast-growing crop, the delay between seedlings and the beginning of harvest time being around forty days. The *E. coli* count in the manure used in the last year of the experiment was among the highest we observed in stored liquid hog manure in Québec (unpublished data), representing a worst-case situation. The application of manure containing high levels of indicator and pathogenic microorganisms a few days before seedlings can then lead to the presence of those microorganisms in the soil at harvest time. Field conditions lead to variations in the persistence of indicator and pathogenic microorganisms in the soil. In this experiment, the overall predicted number of days required to reach undetectable levels of *E. coli* ($\alpha = 0.10$) varied between 37 and 97 in the sandy loam (3 years of data) and 50 to 124 days in the loamy sand (1 year of data). However, no indicator and pathogenic microorganisms were detected on harvested vegetables. A delay of 100 days between manure application and harvest would then appear to be a safe practice on a sandy loam in Québec. Nevertheless, more data are needed to determine a safe delay between LHM application and harvest in other soil types.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Tom Sanderson for his collaboration in writing this article. The technical support by Louise Lessard and Louise Beausoleil is also greatly appreciated.

REFERENCES

Baloda, S. B., L. Christensen and S. Trajcevska. 2001. Persistence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2859-2862.

Bogosonjian, G., L. E. Sammons, P. J. L. Morris, J. P. O'Neil, M. A. Heitkamp and D. B. Weber. 1996. Death of *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 4114-4120.

Chapman, P. A., C. A. Siddons, J. Manning and C. Cheetham. 1997. An outbreak of infection due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in four families: the influence of laboratory methods on the outcome of the investigation. *Epidemiol. Infect.* 119: 245-250.

Choudhary, M., L. D. Bailey and C. A. Grant. 1996. Review of the use of swine manure in crop production effects on yield and composition and on soil and water quality. *Waste Man. Res.* 14: 581-595.

Cieslak, P. R., T. J. Barrett, P. M. Griffin, K. F. Gensheimer, G. Beckett, J. Buffington and M. G. Smith. 1993. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet.* 342: 367.

Cools, D., R. Merckx, K. Vlassak and J. Verhaegen. 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl. Soil Ecol.* 17: 53-62.

CRAAQ (Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec). 2003. Guide de référence en fertilisation. 1st ed. CRAAQ.

Crane, S. R. and J. A. Moore. 1985. Modeling enteric bacterial die-off: a review. *Water Air Soil Poll.* 27: 411-439.

Findlay, C. R. 1972. The persistence of *Salmonella* Dublin in slurry in tanks and on pasture. *Vet. Rec.* 91: 233-235.

Guan, T. Y. and R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness - a review. *J. Environ. Qual.* 32: 383-392.

Jiang, X., J. Morgan and M. P. Doyle. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2605-2609.

Kaufmann, M. E. and T. L. Pitt. 1994. Pulse-field gel electrophoresis of bacterial DNA, chapter 8. *In* Chart (ed.), *Methods in practical laboratory bacteriology*. CRC Press, London. UK.

Lejeune, J., T. E. Besser and D. D. Hancock. 2001. Cattle water trough as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3053-3057.

Natvig, E. E., S. C. Ingham, B. H. Ingham, L. R. Cooperband and T. R. Roper. 2002. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2737-2744.

Reddy, K. R., R. Khaleel and M. R. Overcash. 1981. Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *J. Environ. Qual.* 10: 255-266.

Sewell, A. M. and J. M. Farber. 2001. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *J. Food Prot.* 64: 1863-1877.

Tannock, G. W. and J. M. B. Smith. 1972. Studies on the survival of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella bovis-morbificans* on soil and sheep faeces. Res. Vet. Sci. 13: 150-153.

Trevisan, D., J. Y. Vansteelant and J. M. Dorioz. 2002. Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. Water Res. 36: 275-283.

TABLES

Table 4.1. Soil characteristics of the experimental fields for the production of pickling cucumber.

	Year			
	1	2	3	
	Soulange sandy loam	St-Damasse sandy loam	Soulange sandy loam	Lachute loamy sand
PH	6,2	6,0	6,5	6,7
Organic matter (%)	2,6	2,4	2,5	2,4
Phosphorus (kg ha ⁻¹)	376	357	219	359
Potassium (kg ha ⁻¹)	236	193	175	118

Table 4.2. Values of regression coefficients for the evaluation of *E. coli* decline in plots fertilized with liquid hog manure, assuming first-order kinetics ($\alpha = 0,10$).

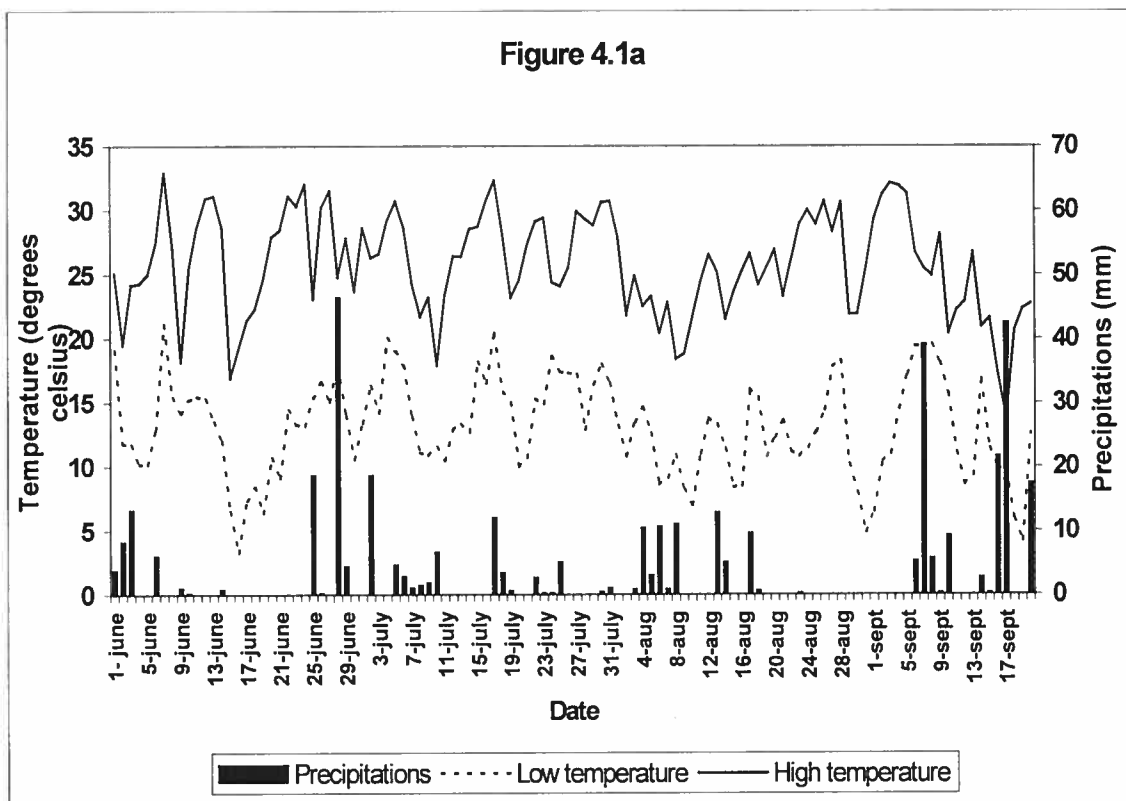
Year	Treatment	Soil type	* R ²	log N ₀	k	** t for N _t = 0
2	115 L	Sandy loam	0.90	4.47 [3.70..5.24]	0.049 [0.031..0.068]	70 [51..97]
2	80 L + 35 E	Sandy loam	0.99	4.65 [3.71..5.58]	0.056 [0.034..0,079]	65 [44..92]
3	80 L + 35 E	Sandy loam	0.82	4.51 [3.61..5.42]	0.063 [0.038..0.087]	56 [37..82]
3	80 L + 35 E	Loamy sand	0.94	3.93 [3.16..4.70]	0.038 [0.017..0.060]	77 [50..124]

* R² was calculated using mean data points

** Estimated number of days required to reach 0 *E. coli* in the surface soil.

FIGURES

Figure 4.1. Daily total precipitation and average low and high temperature for the second (Figure 1a) and third year (b) of experiment for the evaluation of *E. coli* and *Salmonella* persistence in the production of pickling cucumber.



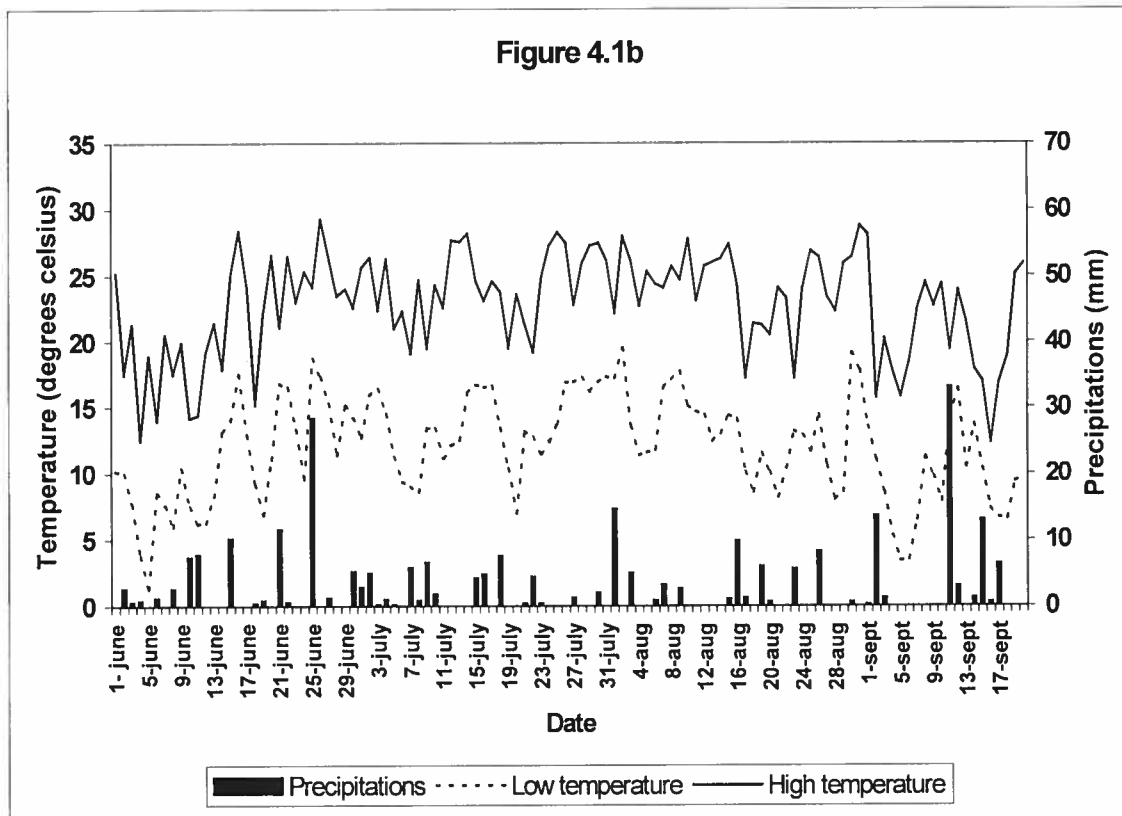
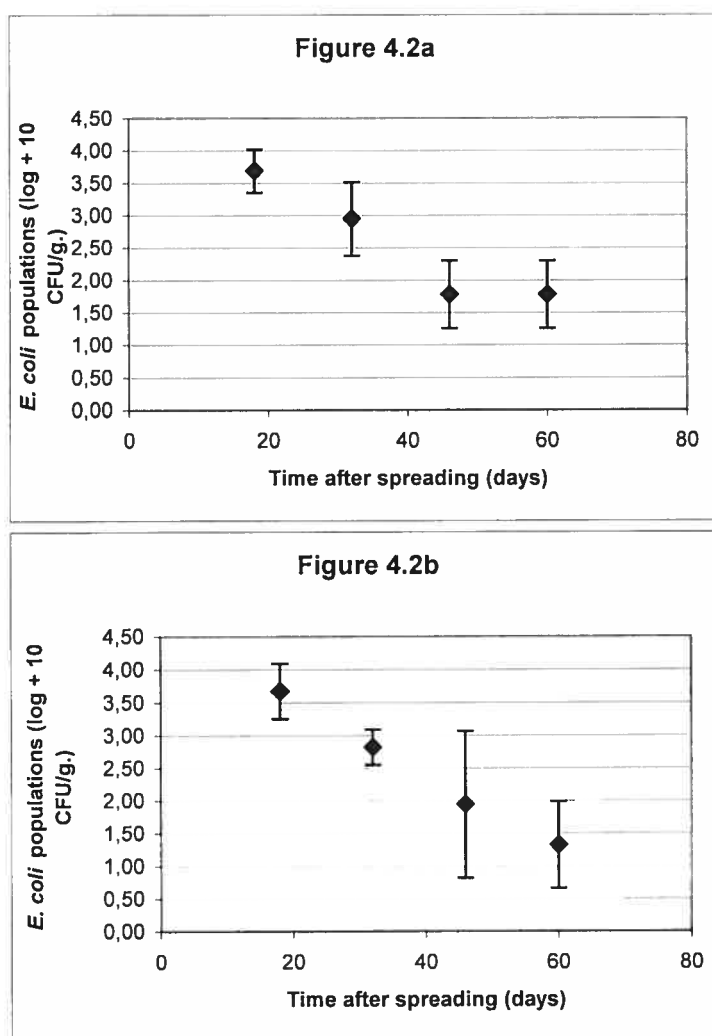


Figure 4.2. *Escherichia coli* populations in the soil for treatments 115 LHM (figure 4.2a) and 80 LHM + 35 MF (Figure 4.2b) in the second year of the experiment; and for treatment 80 LHM + 35 MF on a sandy loam (Figure 4.2c) and on a loamy sand (figure 4.2d) in the third year of the experiment. Each point represents mean of four samples; errors bars indicate \pm standard deviation. Log was calculated from CFU + 10 for calculation of the mean and standard deviation. Therefore, a value of 1.0 log CFU/g represents no *E. coli* detected.



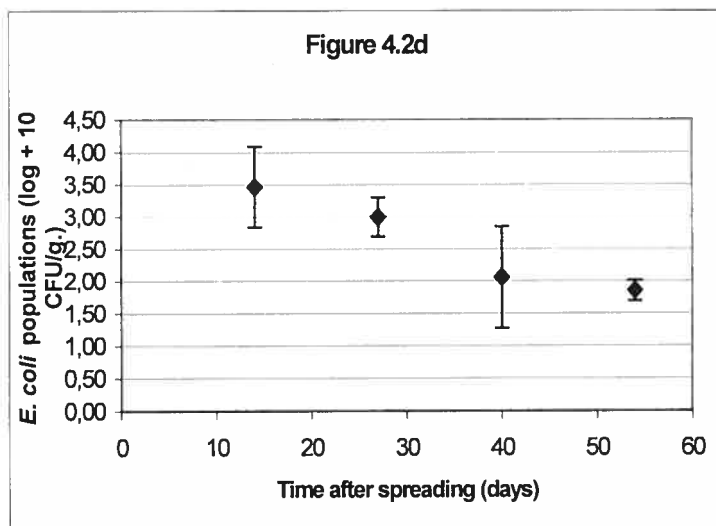
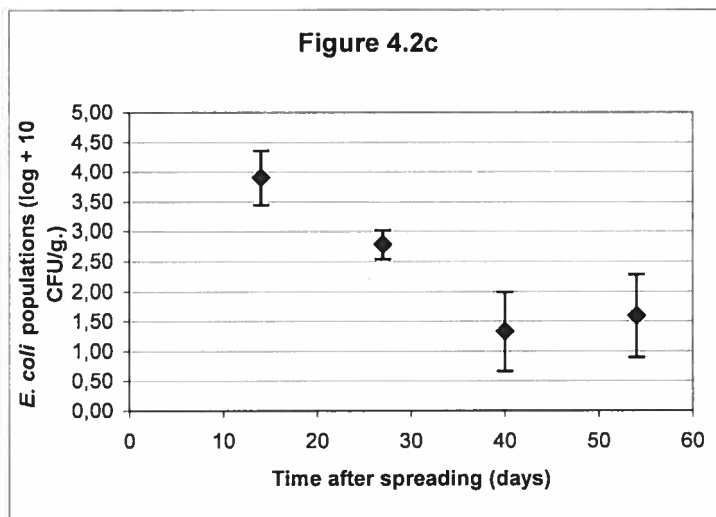
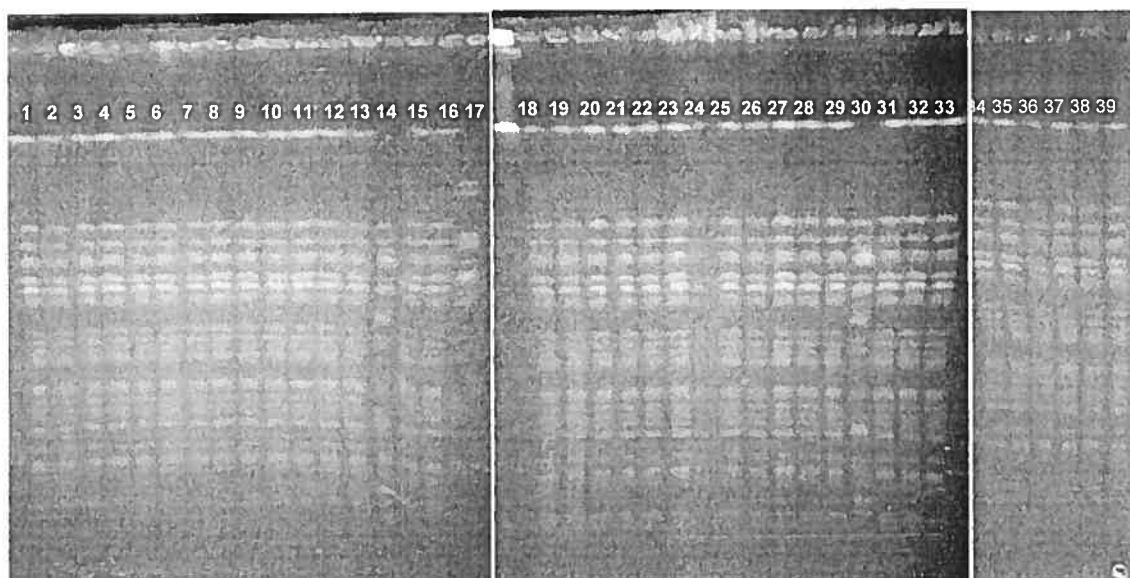


Figure 4.3. Genetic profiles of *Salmonella* isolates (restriction enzyme *SpeI*) found in liquid hog manure and in soil after liquid hog manure spreading in the production of pickling cucumber.



Isolate	Sample	Time after spreading (days)	Treatment	Repetition
1 - 2	Liquid hog manure			
3 - 4	Soil (sandy loam)	14	80 LHM + 35 MF	1
5 - 6	Soil (sandy loam)	14	80 LHM + 35 MF	3
7 - 8	Soil (sandy loam)	14	80 LHM + 35 MF	4
9 - 10	Soil (loamy sand)	14	80 MF + 35 MF	2
11 - 12	Soil (loamy sand)	14	80 LHM + 35 MF	2
13	Soil (loamy sand)	14	80 LHM + 35 MF	4
14	Control			
15 - 16	Liquid hog manure			
17	Control			
18 - 19	Liquid hog manure			
20 - 21	Soil (sandy loam)	27	80LHM + 35 MF	1
22 - 23	Soil (sandy loam)	27	80 MF + 35 MF	2
24 - 25	Soil (sandy loam)	27	80LHM + 35 MF	3
26 - 27	Soil (loamy sand)	27	80LHM + 35 MF	2
28 - 29	Soil (loamy sand)	27	80LHM + 35 MF	4
30	Control			
31- 32 - 35	Soil (loamy sand)	40	80LHM + 35 MF	3
33 - 34	Soil (loamy sand)	40	80LHM + 35 MF	2
36 - 39	Soil (loamy sand)	54	80LHM + 35 MF	1

CHAPITRE 5

**REDUCTION OF INDICATOR AND PATHOGENIC MICROORGANISMS BY
PSYCHROPHILIC ANAEROBIC DIGESTION IN SWINE SLURRIES.**

**Manuscript publié dans *Bioresource Technology*
2006, 97: 686-691**

**Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by
psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries.**

¹ Caroline Côté *, ² Daniel I. Massé and ³ Sylvain Quessy

¹ Research and Development Institute for the Agri-environment, 3300 Sicotte,
Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7B8.

² Dairy and Swine Research and Development Centre, Research Branch,
Agriculture and Agri-Food Canada, Lennoxville, Quebec, Canada, J1M 1Z3.

³ Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, C.P. 5000, 3200
Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

* Corresponding author. Tel.: 450-778-6522; Fax : 450-778-6539; [REDACTED]
[REDACTED]

RÉSUMÉ

L'objectif de ce projet était d'évaluer l'efficacité d'un traitement anaérobie à basse température à réduire les populations viables de microorganismes indicateurs (*E. coli* et coliformes totaux) et la présence de microorganismes pathogènes spécifiques (*Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium* et *Giardia*) dans des lots de lisiers de porcs de différentes origines. L'étude a été conduite dans des bioréacteurs à alimentation séquentielle d'un volume de 40 litres. Les résultats indiquent que la digestion anaérobie du lisier de porcs à 20°C pendant 20 jours: 1) a réduit les populations de coliformes présentes dans le lisier de 97.94 à 100%; 2) a réduit les populations de *E. coli* présentes dans le lisier de 99.67 à 100%; 3) a permis d'atteindre des niveaux non-détectables de souches indigènes de *Salmonella*, *Cryptosporidium* et *Giardia*. Elle peut être considérée comme une méthode prometteuse pour réduire les populations de microorganismes indicateurs et pathogènes présentes dans le lisier de porcs.

Mots-clés: lisier de porcs, digestion anaérobie, microorganismes pathogènes.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of a low temperature anaerobic treatment to reduce viable populations of indicator microorganisms (total coliforms, *Escherichia coli*) and the presence of selected pathogens (*Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium* and *Giardia*) in swine slurries from different sources. Experiments were carried out in 40-L Sequencing Batch Reactors (SBRs). Experimental results indicated that anaerobic digestion of swine manure slurry at 20°C for 20 days in an intermittently fed SBR: 1) reduced indigenous populations of total coliforms by 97.94 to 100%; 2) reduced indigenous populations of *Escherichia coli* by 99.67 to 100%; 3) resulted in undetectable levels of indigenous strains of *Salmonella*, *Cryptosporidium*, and *Giardia*. It can be considered as a promising method for reducing indigenous indicator and pathogenic microorganisms populations in liquid swine manure slurries.

Key words: swine slurry, anaerobic treatment, pathogens.

INTRODUCTION

Canada is one of the most important pork producing countries in the world. Over the past 20 years, the swine industry has evolved from a diversified to a specialized and intensified production system. It has grown more than 400% since 1982 (CCP, 2001). Rapid growth has led to difficulties in the management of swine manure, resulting in serious environmental concerns. Environmental problems related to manure management include air, water and soil pollution and health hazards caused by the presence of zoonotic pathogens in the manure. Major pathogens include *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *Cryptosporidium* and *Giardia* (Guan and Holley, 2003). There is an urgent need for cost-effective biotechnologies to address the above environmental issues.

Anaerobic digestion may be defined as the engineered methanogenic anaerobic decomposition of organic matter. It involves different species of anaerobic microorganisms that degrade organic matter. Non-methanogenic populations depolymerize organic polymers and ferment them to acetate, hydrogen, and carbon dioxide. Methanogenic bacteria convert those by-products to methane (Chynoweth *et al.*, 1999). Massé *et al.* (1996; 1997a; 1997b) evaluated the feasibility of using psychrophilic anaerobic digestion (PAD) at 20 °C in non-mixed and intermittently fed Sequencing Batch Reactors (SBRs) to stabilize and deodorize swine manure slurry while recovering biogas for energy. Experimental results indicated that PAD of swine manure slurry in SBRs was technically feasible to stabilize and deodorize swine manure slurry. It produced high quality biogas and provided excellent settling conditions to retain high concentrations of anaerobic bacteria in the system.

Few studies have been carried out to assess the efficiency of anaerobic digestion to remove pathogens from organic wastes. Bendixen

(1994) indicated that thermophilic temperature destroyed pathogens, while mesophilic temperature had no effect on reduction of pathogens. Kumar *et al.* (1999) investigated the survival of some pathogens in anaerobic batch reactors. *E. coli* and *Salmonella* survived up to 20 and 10 days at temperatures of 20 and 35 °C respectively. Duarte *et al.* (1992) have been successful in using anaerobic digestion at 37 and 54.9°C to remove *Salmonella*, *Streptococci* and coliforms from swine slurry. Kearny *et al.* (1993) investigated the efficiency of full scale AD reactor operated at 28 °C to remove pathogenic bacteria. *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Y. enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* were only partially removed during the treatment period. There is minimal information published on the efficiency of low temperature anaerobic process (15 –20 °C) to remove pathogens, especially *Cryptosporidium* and *Giardia*, in swine slurries from different sources differing in their microbiological and physico-chemical properties.

Therefore the objective of this study was to evaluate the efficiency of the psychrophilic anaerobic digestion process in a sequencing batch reactor to reduce viable populations of indicator microorganisms (total coliforms, *E. coli*) and indigenous pathogens (*Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *Cryptosporidium* and *Giardia*) in swine slurries from different sources.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Experimental conditions. A schematic of the bench scale SBR used in this study is presented in figure 5.1. Four 42 L plexiglas digesters were located in a temperature controlled room (20°C). The sludge volume at the beginning of a cycle was 21 L. SBRs were mixed 5 minutes every morning by recirculating the biogas. Wet tip gas meters were used to measure the daily biogas production.

Fresh manure slurries were obtained from manure transfer tanks and long term storages located on commercial growing-finishing, nursery and maternity hog operations. The samples of manure collected on commercial farms were sent to the Agriculture and Agri-food Canada Laboratory in Lennoxville (Québec, Canada) and used to feed to the laboratory scale digestors within 48 hours period.

The cycle time is defined by:

$$t_c = t_f + t_r + t_{sd}$$

where t_c represent the total treatment cycle time, t_f represent the duration of the feed period, t_r represents the duration of the react period and t_{sd} the duration of the settle and draw periods. Final reaction and settling occurred at the end of the react period. Draw times were less than one-half hour. Feed and react period length of 2 weeks each (total treatment cycle length of 4 weeks) had been used in this study.

Organic loading rates are based on the amount of COD fed to the volume of sludge present at the start of a cycle (21L). The loading equation is as follow:

$$L_{s,f} = \frac{V_f C}{V_s t_f}$$

where $L_{S,f}$ is loading rate based on initial sludge volume and feed time; V_f is the volume of feed; C is the COD concentration in the feed; V_S is the volume of sludge at the beginning of a cycle; and t_f is the fill time.

The reactors were fed at different organic loading rates due to physical constraints. Some of the manure slurry was so diluted that the bioreactor were not large enough to receive sufficient volume to reach the design organic loading rate of 2.00 g COD / L-d (Table 5.1).

Sampling. Before feeding the SBRs, samples of sludge and fresh manure were taken for physico-chemical and microbiological analysis. At the end of each treatment cycle, after the sedimentation period, one sample was withdrawn from the supernatant for microbiological analysis. All samples were kept at 4 degrees until the microbiological analysis, which was done less than 24 hours after sampling.

Physico-chemical analysis. Fresh manure samples were analysed for total volatile fatty acids (VFAs), alkalinity, total chemical oxygen demand (TCOD), Soluble COD (SCOD), and total and volatile solids. SCOD was determined by analysing the supernatant of centrifuged slurry. The pH, alkalinity, and solids were determined using standard methods (APHA, 1992).

Microbiological analysis. Microbiological analysis of raw and treated swine slurry was done within 24 hours after sampling. Microorganisms included in the study were: coliforms, *E. coli*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *Cryptosporidium*, and *Giardia*.

Coliforms and *E. coli* were quantified by plating 3M Petrifilms plate (3M Microbiology Products, St. Paul, MN) with 1 ml of intact or diluted liquid hog manure. Dilutions were made with phosphate- buffered saline. Pink colonies

producing gas were counted as coliforms, and blue ones with gas were counted as *E. coli*.

In order to verify the presence of *E. coli* O:157, 25 g of the sample were incubated in 225 ml of modified Tryptic soy broth with novobiocin for 24 h at 42°C. One loopful of the culture was inoculated onto modified sorbitol MacConkey agar (Difco Laboratories, Sparks, MD) containing tellurite, cefixime, and cefsulodin. Suspect (colorless) colonies were used to inoculate purple broth base with cellobiose. Biochemical assays (indole, MR, VP, citrate) were used to confirm the identification of cellobiose negative colonies (Health Canada, 2001).

Salmonella was detected by incubating 25 g of the samples in 225 ml of nutrient broth (Difco Laboratories) overnight at 37°C. Following this pre-enrichment step, one ml of nutrient broth was incubated into 9 ml of Tetrathionate Brilliant Green broth (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) overnight at 37°C. One loopful of the TBG culture were inoculated onto a Brilliant Green Sulfa agar (Difco) containing 20 µg/ml of novobiocine (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) and incubated for 24 to 48 hours at 37°C. Lactose negative colonies were tested biochemically (triple sugar iron and urea hydrolysis) and identification was confirmed by API processing (Biomérieux, Ville St-Laurent, Québec, Canada) (Letellier *et al.*, 1999).

For the detection of *Y. enterocolitica*, 10 grams of samples were incubated in 90 ml of phosphate-buffered saline containing sorbitol (2%) and biliary salts (0.15%) at 4°C for 21 days. Isolation was carried out on *Yersinia* agar base (cefsulodin-irgasan-novobiocin agar, Oxoid) with an incubation time of 24 to 48 h at 28°C. Typical colonies were biochemically tested (Triple Sugar Iron and urea hydrolysis). Biochemical profiles (API, Biomérieux) were used to complete the identification (Pilon *et al.*, 2000).

The detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* was done using Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Prospect *Cryptosporidium* microplate assay and Prospect *Giardia* microplate assays (Alexon-Trend, Inc., Ramsey, MN) were performed according to manufacturer's instructions.

RESULTS AND DISCUSSION

The characteristics of fresh manure slurries used to feed the bioreactors were highly variable (Table 5.2). Total VFAs, total COD, and total solids varied from 0.4 to 34 mg/L, 12.9 to 96.3 mg/L, and 1.1 to 15.2% (weight basis) respectively.

Sludge samples taken in SBRs before the beginning of the experiment were free of coliforms, *E. coli*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *Cryptosporidium*, and *Giardia*. *E. coli* O:157 and *Yersinia enterocolitica* were not detected in any sample of raw manure slurries. The fresh manure slurries indicator and pathogenic microorganisms content is presented in table 5.3a. Total coliforms counts varied from 0 to 3.3×10^6 CFU/g. Initial *E. coli* populations were also highly variable, ranging from 0 to 2.6×10^6 CFU/g. *Salmonella*, *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected in 7, 4, and 2 samples respectively.

The treatment resulted in undetectable levels of coliforms in 9 out of 20 manure samples (Table 5.3b). One liquid swine manure did not contain coliforms before the treatment. In the remaining 10 samples, a reduction of 1.62-4.23 log CFU/ml was observed (97.94-99.99% reduction). Olsen (1988) observed the impacts of mesophilic (35°C) anaerobic filter treatment on indigenous coliforms populations in liquid pig manure. He reported an average reduction of 1.1 and 1.0 log CFU/ml for hydraulic retention times of 4.2 and 0.8 days respectively.

Undetectable levels of *E. coli* were observed in 15 out of 20 samples of swine manure slurries after anaerobic digestion (Table 5.3b). In the five remaining samples, a reduction of 2.48 - 4.16 log CFU/ml was observed (99.67 to 99.99% reduction). Juris *et al.* (1996) observed similar results at higher temperature. These authors reported a complete elimination of *E. coli* EC 5 strain after a 18 days anaerobic mesophilic (35-37°C) digestion of pig slurry in a 800 L fermenter. Kumar *et al.* (1999) used an ampicillin-resistant strain of *E. coli* to study the persistence of this bacteria in cattle dung slurry during anaerobic digestion. The survival was 25 days at room temperature (18 to 25°C) and 15 days at 35°C.

In the present study, psychrophilic anaerobic digestion resulted in undetectable levels of *Salmonella* in the seven swine manure slurries initially found positive for this bacteria. Kumar *et al.* (1999) reported a longer survival of artificially added streptomycin-resistant strain of *Salmonella* Typhi in cattle dung slurry during anaerobic digestion. They observed a complete elimination of this bacteria on the fifteenth day at 35°C and on the twentyfifth day at room temperature. The survival time of *Salmonella* Typhi increased when the solid contents of the digester were elevated from 9% to 15%. The mean decimal reduction time (T_{90}) of *Salmonella* during a full scale mesophilic anaerobic digestion was 34.5 days according to Kearny *et al.* (1993).

Psychrophilic anaerobic digestion destroyed *Cryptosporidium* and *Giardia* present in 4 and 2 samples of liquid swine manure respectively. This is the first report on the impact of psychrophilic anaerobic digestion on those parasites.

Temperature and retention time are decisive factors for indicator organisms and pathogens survival during anaerobic digestion of effluents. According to Olsen and Larsen (1987), hygienization similar to anaerobic thermophilic treatment is obtained at mesophilic temperatures by increasing

retention time. Kumar *et al.* (1999) observed a faster elimination of *E. coli* and *Salmonella* at 35°C than at room temperature during anaerobic digestion of cattle slurry. *Salmonella* Typhimurium, *Y. enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* also declined more rapidly at 17°C than at 4°C during anaerobic digestion of cattle slurry (Kearny *et al.*, 1993). It appears that under the conditions of this experiment, retention time of 20 days at 20°C was sufficient to ensure a stabilization of the liquid swine manure.

It is important to note that in most reported experiments, only one source of manure slurry was used and the reduction of bacterial load monitored at various periods during the treatment. In this study, a different approach was taken to consider variation in microbial and physico-chemical characteristics of manure from different sources, focusing on the end product of anaerobic digestion. According to Olsen and Larsen (1987), decimation times of pathogens and indicator microorganisms were not influenced by the type of slurry (cattle or pig). However, no data were available with different sources of slurry for a specific animal species. Our results have shown the effectiveness of the psychrophilic anaerobic digestion with swine manure slurry from different sources.

Many experiments concerning the impact of anaerobic digestion on indicator and pathogenic microorganisms have been made by inoculating manure slurries with laboratory or antibiotic-resistant strains. This last approach is useful since the strains can be selected on agar containing antibiotics after the treatment. According to Olsen et Larsen (1987), laboratory strains can be less resistant than coliforms indigenous to the slurry. However, Abdul and Lloyd (1985) observed a longer persistence of antibiotic-resistant strains of *E. coli* compared to sensitive isolates during anaerobic digestion of pig slurry at 37°C. The use of natural liquid swine manure slurries permitted us to confirm the effectiveness of the psychrophilic anaerobic digestion on indigenous microorganisms.

Tappouni (1984) demonstrated in laboratory studies that the maximum biogas production during semi-continuous digestion at a hydraulic retention time of 7.5 days corresponded to an increase effect in reducing the numbers of *Salmonella* spp. This decline was correlated with increased volatile fatty acids and a decrease in pH. However, concentrations in the range of 2000 mg/L can inhibit biomethagenesis (Winter et Wildenauer, 1984). It was thus important to verify if volatile fatty acid levels permitting the destruction of pathogens without affecting biomethagenesis were obtained.

TVFAs accumulated in the SBRs during the fill period and the early stage of the react period at levels ranging from 100 to 3000 mg/L (data not shown). For each treatment cycle, the volatile fatty acids were completely utilized at the end of the react period. From these results it can be concluded that the SBRs were very stable at these loading rates and operating conditions.

CONCLUSION

Psychrophilic anaerobic digestion in sequencing batch reactors successfully treated raw swine manure slurries from different sources. It removed the indigenous populations of *Salmonella*, *Cryptosporidium*, and *Giardia*. Natural populations of indicator microorganisms (*E. coli* and coliforms) were reduced by 97.94 to 100%.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was financially supported by the Livestock environmental initiative and the Fédération des Producteurs de Porcs du Québec. The technical support by Katline Guay, Louise Beausoleil, Louise Lessard, Lucie Masse, and D. Deslauriers was appreciated.

REFERENCES

- Abdul, P. and D. Lloyd. 1985. The survival of antibiotic resistant and sensitive *Escherichia coli* strains during anaerobic digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 373-377.
- APHA 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th. ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Bendixen, H. J. 1994. Safeguards against pathogens in Danish biogas plants. *Wat. Sci. Tech.* 30: 171-180.
- Canadian Pork council (CPC). 2001. Statistics. Available online at <http://www.cpc-ccp.com/stats.html> (verified 28 oct. 2002). Canadian Pork Council, Ottawa, ON.
- Chynoweth, D. P., A. C. Wilkie and J. M. Owens. 1999. Anaerobic treatment of piggery slurry-review. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 12: 607-628.
- Duarte, E. A., B. Mendes, and J. S. Oliveira. 1992. Removal of *Salmonella*, *Streptococci* and coliforms in pig breeding effluent by anaerobic mesophilic digestion. *Wat. Sci. Tech.* 26: 2169-2172.
- Guan, T. Y. and R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness-A review. *J. Environ. Qual.* 32: 383-392.
- Health Canada. 2001. Isolation of *E. coli* O157 in foods. Available online at <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment> (mars 2001).

Juris, P., F. Toth, A. Laukova, P. Plachy, P. Dubinsky and J. Sokol. 1996. Survival of model bacterial strains and helminth eggs in the course of mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Vet. Med. - Czech.* 5: 149-153.

Kearny, E. T., Larkin, M. J., Frost, J. P. and P. N. Levett. 1993. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 215-219

Kumar, R., Gupta, M. K. and Kanwar, S. S., 1999. Fate of bacterial pathogens in cattle dung slurry subjected to anaerobic digestion. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 335-338.

Letellier, A., S. Messier and S. Quessy, 1999. Prevalence of *Salmonelle* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *J. Food Prot.*, 62: 22-25.

Massé, D. I., N. K. Patni, R. L. Droste, and K. J. Kennedy. 1996. Operation strategies for psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Can. J. Civ. Engin.* 23: 1285-1294.

Massé, D. I., R. L. Droste, K. J. Kennedy, and N. K. Patni. 1997a. Potential for the psychrophilic anaerobic treatment of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Can. Agricul. Engin. J.* 39: 25-33.

Massé, D. I. and R. L. Droste, 1997b. Microbial interaction during anaerobic treatment of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Can. Agricul. Engin. J.* 39: 35-41.

Olsen, J. E. and H. E. Larsen. 1987. Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biol. Wastes.* 21: 153-168.

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.

Pilon, J., R. Higgins and S. Quessy. 2000. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Québec. *Canadian Veterinary Journal*, 41: 383-387.

Tappouni, Y. A. 1984. The fate of *Salmonella* in anaerobic digestion. PhD Thesis. University college, Cardiff, UK.

Winter, J., and F. X. Wildenauer. 1984. Comparison of volatile acid turnover during improved digestion of sewage sludge, cattle manure, and piggery wastes. Third European Congress of Biotechnology, Munchen, Germany. Weinheim. 3: 81-87.

Table 5. 1. Description of volume and loading rates of swine slurries from various sources in different psychrophilic anaerobic digestion assays.

Treatment cycle	Bioreactor identification	Manure identification	Amount of manure fed (L)	Loading rate (COD/L-d)
1	7	41	15.0	1.33
2	8	40	5.2	1.87
3	9	40	5.2	1.87
4	10	42	15.0	1.06
5	7	66	5.6	2.00
6	8	69	6.2	2.00
7	9	68	15.0	1.61
8	10	67	9.6	2.00
9	7	85	6.6	2.00
10	8	84	15.0	0.73
11	9	83	12.0	2.00
12	10	82	8.0	2.00
13	7	121	11.5	2.00
14	8	119	11.7	1.58
15	9	118	11.4	1.92
16	10	123	9.9	1.84
17	7	167	7.9	2.00
18	8	168	15.0	1.23
19	9	170	8.7	2.00
20	10	169	15.0	1.40

Table 5. 2. Characteristics of swine slurries from different sources used to fill psychrophilic anaerobic digestors.

Manure identification	Total VFA (g/L)	Alcalinity	COD (g/L)		Solides (%)	
			Total	Soluble	Total	Volatiles
40	10.4	n/a	95.8	20.2	5.2	3.9
41	7.2	n/a	23.6	11.3	1.7	1.1
42	4.9	n/a	18.7	8.8	1.4	0.9
66	23.2	19.7	96.3	47.0	15.2	13.8
67	9.4	13.3	55.4	17.4	5.4	3.4
68	6.2	13.0	28.6	11.4	3.1	1.6
69	15.6	n/a	85.6	33.2	5.6	4.3
82	12.7	11.3	66.4	20.8	4.1	3.4
83	7.9	7.0	44.4	15.1	3.0	2.1
84	0.4	8.0	12.9	2.1	1.1	0.6
85	34.0	19.3	81.8	24.6	4.4	2.9
118	4.0	n/a	44.6	9.2	1.7	1.1
119	8.8	n/a	36.0	14.3	1.9	1.3
121	9.1	n/a	46.3	17.0	2.5	1.8
123	22.9	n/a	49.3	33.8	2.4	1.5
167	16.9	n/a	66.8	28.1	3.4	2.3
168	7.6	n/a	21.8	14.3	1.6	1.0
169	9.8	n/a	24.9	15.6	1.5	1.0
170	19.6	n/a	61.6	33.9	3.6	n/a

Table 5. 3a. Indicator and pathogenic microorganisms content of raw manure samples.

Manure sample	Total coliforms (CFU/g)	<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
40	550 000	360 000	+	-	-
41	14 600	12 000	+	-	-
42	120 000	84 000	+	-	-
66	20 000	6 000	- ¹	+	-
67	14 500	8 200	+	+	-
68	42 000	27 000	+	+	-
69	109 000	51 000	+	+	-
82	170 000	160 000	-	-	-
83	30 000	21 000	-	-	-
84	3 400	3 000	-	-	+
85	0	0	-	-	-
118	22 000	17 000	-	-	-
119	660 000	500 000	-	-	-
121	3 300 000	2 600 000	-	-	+
123	35 000	22 000	-	-	-
167	25 000	14 000	-	-	-
168	4 000	2 900	+	-	-
169	26 000	22 000	-	-	-
170	60 000	52 000	-	-	-

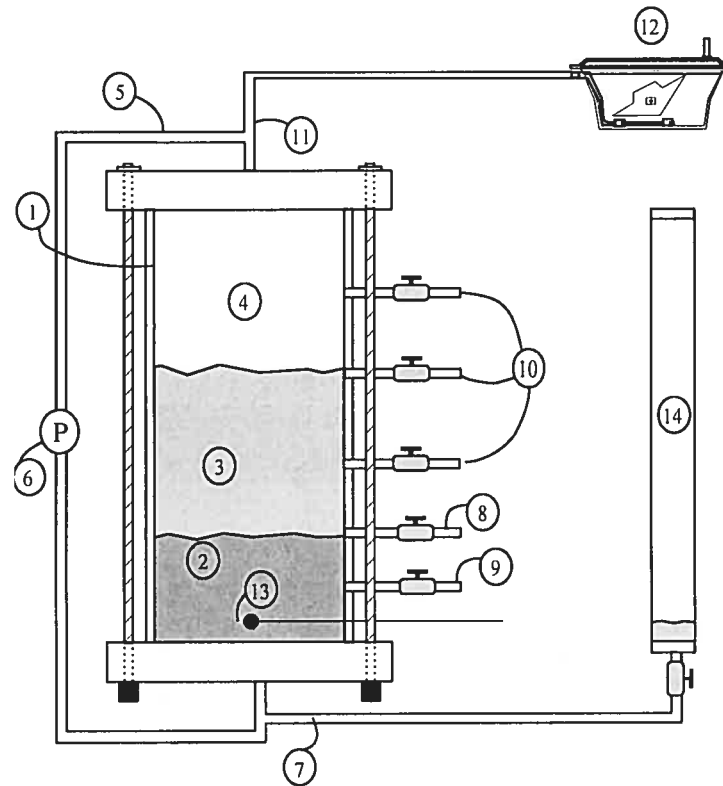
¹ Not detected

Table 5. 3b. Indicator and pathogenic microorganisms content of treated effluents.

Manure sample	Total coliforms (CFU/g)	<i>Escherichia Coli</i> (CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
40	0	0	- ¹	-	-
41	0	0	-	-	-
42	0	0	-	-	-
66	0	0	-	-	-
67	20	0	-	-	-
68	40	30	-	-	-
69	10	0	-	-	-
82	10	0	-	-	-
83	20	10	-	-	-
84	70	10	-	-	-
85	0	0	-	-	-
118	10	0	-	-	-
119	120	60	-	-	-
121	450	180	-	-	-
123	0	0	-	-	-
167	30	0	-	-	-
168	0	0	-	-	-
169	0	0	-	-	-
170	0	0	-	-	-

¹ Not detected

Figure 5.1. Schematic diagram of the laboratory scale bioreactors.



1. Bioreactor
2. Sludge bed zone
3. Fill Zone
4. Gas space
5. Biogas recirculation line
6. Biogas recirculation pump
7. Feeding line
8. Emptying port
9. Sludge sampling port
10. Mixed liquor sampling port
11. Gas outlet
12. Gaz meter
13. Thermocouple
14. Feeding system

CHAPITRE 6

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les cas d'infection chez l'homme reliés à la consommation de fruits et légumes sont en hausse en Amérique du Nord. La possible contamination des fruits et légumes est d'autant plus inquiétante qu'ils sont souvent consommés sans avoir subi préalablement de traitement thermique qui peut éliminer les microorganismes pathogènes. Plusieurs sources potentielles de contamination microbiologique de ces produits sont présentes à la ferme, les fumiers figurant parmi les plus importantes.

Au Québec, la production porcine s'élève maintenant à plus de 7 millions d'animaux par année (IRDA, 2003). Elle produit environ 30% du volume total des déjections animales pour l'ensemble de la province (IRDA, 2003). Le lisier de porcs peut contenir plusieurs types de microorganismes pathogènes pour l'homme dont *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. Il est donc justifié de se questionner sur les risques microbiologiques reliés à l'épandage du lisier de porcs dans les cultures destinées à la consommation humaine.

L'hypothèse de base à vérifier dans le cadre de cette étude était que: *L'épandage de lisier de porcs dans les cultures maraîchères représente un risque potentiel pour la santé humaine. Par conséquent, des mesures doivent être prises pour réduire ce risque.*

Afin de vérifier cette hypothèse, trois objectifs principaux ont été ciblés: 1) préciser le contenu du lisier de porcs en microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme (MPPH); 2) déterminer le potentiel de survie des MPPH dans le sol et sur les légumes suite à l'épandage de lisier de porcs. 3) vérifier l'impact de procédures d'assainissement du lisier de porcs sur les MPPH.

La réflexion faite dans le cadre de cette étude peut être abordée sous la forme d'analyse du risque, dont la démarche comporte 5 étapes:

- Identification d'un danger potentiel
- Caractérisation du danger
- Caractérisation de l'exposition
- Conséquences de l'exposition
- Caractérisation du risque

Dans un premier temps, il est donc nécessaire de préciser si, dans le contexte québécois, le lisier de porcs destiné à l'épandage contient des microorganismes représentant un risque potentiel pour la santé humaine (identification des dangers potentiels).

Peu d'études ont été menées à ce jour dans le but de préciser le contenu en microorganismes pathogènes du lisier de porcs destiné à l'épandage. Les données publiées dans la littérature scientifique jusqu'à maintenant concernaient principalement les matières fécales fraîches de porcs. Celles-ci étaient prélevées dans les bâtiments d'élevage ou suite à l'abattage, dans une optique de salubrité des viandes (Letellier *et al.*, 1999). Il est reconnu que l'entreposage entraîne une réduction des populations de MPPH (Munch *et al.*, 1987). Il est donc impossible d'utiliser ces données pour décrire le contenu microbiologique du lisier de porcs accumulé dans les fosses d'entreposage.

De plus, dans la littérature scientifique, l'impact de l'entreposage sur le contenu microbiologique du lisier a été mesuré en laboratoire à température fixe. L'ajout continu de lisier frais dans les fosses commerciales ainsi que les fluctuations de température rendent difficile l'utilisation de ces résultats pour décrire le comportement des microorganismes pathogènes à la ferme.

La première partie de cette étude nous a permis de démontrer que, dans le contexte québécois, il est possible de trouver des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme dans le lisier de porcs destiné à l'épandage. Les populations de *E. coli*, utilisé comme indicateur, se sont avérées très variables (0 à 5,52 log₁₀ UFC/g). Ceci pourrait s'expliquer notamment par la température à laquelle le lisier a été soumis dans les fosses d'entreposage ainsi que la proportion de lisier récemment ajouté à la fosse comparativement au lisier accumulé depuis plusieurs semaines. Le pourcentage d'échantillons positifs à *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. a été estimé à 37%, 9% et 3% respectivement.

Bien que des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme aient été trouvés dans le lisier de porcs, il est nécessaire de préciser si ceux-ci possèdent les attributs nécessaires pour causer l'infection chez l'homme (caractérisation du danger).

Des populations importantes de *E. coli* ont été retrouvées dans le lisier de porcs destiné à l'épandage dans le cadre de cette étude. Cette bactérie est un indicateur de contamination fécale, c'est à dire que sa présence indique la présence possible de microorganismes pathogènes. Il est admis dans la communauté scientifique que toutes les souches de *Salmonella* spp. doivent être considérées comme représentant un risque potentiel pour la santé humaine. La dose infectieuse de ce microorganisme peut être très faible, pouvant atteindre de 1 à 10 organismes (D'aoust *et al.*, 1998; Kapperud *et al.*, 1990). Quant à *Yersinia enterocolitica*, il est maintenant admis que le porc est un réservoir important des sérotypes reliés à l'infection chez l'homme, soient O:3, O:9; O:5 et O:8. (Pilon *et al.*, 2000). La dose infectieuse de *Yersinia enterocolitica* est inconnue, mais elle pourrait excéder 10⁴ UFC selon Robins-Browne (2001). Il est par ailleurs reconnu que *Cryptosporidium* peut se transmettre entre plusieurs espèces de mammifères (Rose, 1997) et causer des problèmes de santé importants chez l'homme.

Les microorganismes identifiés dans le lisier de porcs dans le cadre de cette étude représentent donc un risque réel pour la santé humaine.

Bien que des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme se retrouvent dans le lisier de porcs, il serait prématuré de conclure, à la lumière de ces résultats, que ceux-ci se retrouveront nécessairement sur les produits consommés et ce, à une concentration suffisante pour causer un problème de santé chez l'homme. La caractérisation de l'exposition permettra de déterminer si les microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme présents dans le lisier de porcs peuvent survivre dans le sol suite à l'épandage et contaminer les produits.

En seconde partie de ce projet, le potentiel de survie de *E. coli* et de *Salmonella* dans le sol de surface suite à l'épandage de lisier de porcs a été évalué. Aucune autre étude de terrain n'a été répertoriée dans la littérature scientifique concernant les aspects sanitaires liés à l'épandage de lisier de porcs en culture maraîchère. *E. coli* a été choisi comme indicateur de contamination fécale dans le cadre de cette expérimentation. Selon des études antérieures comparables, cette bactérie s'est avérée efficace pour prédire la présence de microorganismes pathogènes telles que *E. coli* O157:H7 (Ogden *et al.*, 2001) et *Salmonella* spp. (Natvig *et al.*, 2004). La présence de *Salmonella* a tout de même été vérifiée dans cette étude, parallèlement à *E. coli*, parce que cette bactérie peut être fréquemment trouvée dans le lisier de porcs destiné à l'épandage au Québec, tel qu'observé en première partie de cette étude.

La culture du cornichon a été choisie parce qu'elle a une saison de croissance relativement courte. Une quarantaine de jours s'écoule entre les semis et le début des récoltes. Cette culture représente donc une situation à risque élevé puisque le délai entre l'épandage du lisier et la récolte des produits est court.

Les populations de *E. coli* dans le sol de surface ont suivi une décroissance exponentielle. Le nombre moyen de jours pour que les populations de *E. coli* deviennent nulles a été estimé entre 55 et 70 jours dans un loam sableux. La prudence est de mise en ce qui a trait à l'interprétation qui peut être faite de ces résultats. En effet, plusieurs variables influencent le potentiel de survie des MPPH. Parmi celles-ci, notons la concentration microbienne du lisier, le type de sol, la température, l'humidité et l'activité microbienne du sol (Reddy *et al.*, 1981; Cools *et al.*, 2001). Outre le contenu du lisier, le type de sol apparaît d'une grande importance puisqu'il est associé aux autres variables. Les données issues de cette étude sont insuffisantes pour comparer les deux types de sol. Toutefois, elles suggèrent une différence puisque la constante de décroissance microbienne fut inférieure dans le sable loameux comparativement au loam sableux. Ceci pourrait s'expliquer notamment par une activité microbienne moindre dans le sable loameux, mais cette variable n'a pas été mesurée dans le cadre de cette étude. La dose de lisier, si elle se situe à l'intérieur des doses agronomiques de 25 à 35 m³/ha, ne semble pas avoir eu un impact majeur sur la persistance de *E. coli*.

E. coli et *Salmonella* n'ont pas été détectées sur les légumes dans le cadre de cette étude. Toutefois, dans certains traitements, ces bactéries étaient présentes dans le sol au moment des récoltes. L'absence de *E. coli* et *Salmonella* sur les produits ne signifie cependant pas que la contamination microbienne des produits est impossible à la ferme. En effet, dans le cadre de cette étude, la récolte manuelle des produits réduisait probablement le risque que des particules de sol ne se retrouvent sur les légumes. Par contre, dans une situation de récolte à la ferme, où une partie des opérations est mécanisée, cette situation pourrait se produire. Il apparaît donc justifié d'établir que le délai sécuritaire à laisser entre l'épandage du lisier et la récolte des produits devrait être basé sur le moment où les populations de *E.*

coli atteignent le seuil de non-détection. Cette approche peut paraître conservatrice, mais d'autres arguments justifient son utilisation.

Premièrement, la chaîne de froid n'est pas toujours respectée au cours de la distribution des produits suite à la récolte. Considérant que des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme peuvent se multiplier sur les légumes (incluant le concombre) lorsque la température excède 5°C (Abdul-Raouf *et al.*, 1993), il est justifié de réduire la charge microbienne à son minimum à la sortie de la ferme.

De plus, une part de la production québécoise du cornichon est destinée au marché frais. Les produits sont donc consommés sans traitement préalable qui aurait pu détruire les microorganismes avant la consommation. Une part importante du marché de ce produit est aussi destinée à la transformation, principalement pour la production de marinades. Cependant, aucune évidence ne nous permet de croire que ce traitement d'acidification détruit les microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme. L'analyse de 3 contenants commerciaux de marinades de cornichons nous a permis de constater que le pH de ce type de produit était autour de 3.6. Il a été démontré dans la littérature scientifique que des entérobactéries telles que *Salmonella* peuvent résister à ces conditions acides.

Il faut aussi garder en tête que le fait de ne pas détecter les microorganismes ne garantit pas leur absence. En effet, chaque technique microbiologique a ses limites et possède un seuil de détection. Dans le cadre de cette étude, la technique de PCR appliquée à *Cryptosporidium*, ainsi que les méthodes d'enrichissement utilisées pour la détection de *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica* ont un seuil de détection estimé à 100 organismes/g. La limite de détection pour l'analyse de *E. coli* par pétrifilms peut s'élever à 100 UFC/g dans les échantillons environnementaux.

Un autre élément doit être considéré en ce qui a trait aux limites des méthodes de détection des microorganismes, particulièrement lorsque les méthodes de culture sont appliquées à des échantillons environnementaux. En effet, il a été proposé que certaines bactéries, soumises à des stress environnementaux, se retrouvent dans un état de dormance apparent alors que leur métabolisme est toujours actif. Elles ne peuvent alors être cultivées en laboratoire. L'acronyme utilisé couramment pour caractériser cet état est VBNC (*viable but noncultivable*). L'ajout d'éléments nutritifs ainsi que l'augmentation de la température ont été reportés comme étant des moyens efficaces d'activer les bactéries viables mais non cultivables et ainsi de les détecter (Roszak *et al.*, 1984). Toutefois, cette théorie fait l'objet de remises en question. Certains auteurs prétendent en effet que les nouveaux paramètres de culture contribuent à la dispersion de cellules qui n'avaient pas été préalablement détectées ou encore à la réponse de cellules aux nouvelles conditions, donnant l'impression d'une réactivation des microorganismes (Bogosonian *et al.*, 1998). Il est à noter que, dans le cadre de cette étude, aucune stratégie n'a été adoptée pour récupérer les cellules qui auraient pu être dans un état viable mais non cultivable.

Différentes approches peuvent être envisagées pour la gestion du risque associé à l'utilisation du lisier de porcs dans la culture du cornichon. Selon les résultats obtenus dans cette étude, le délai qui devrait être laissé entre l'épandage de lisier de porcs et la récolte des produits est de 100 jours (limite supérieure de l'intervalle de confiance à 90%) dans un loam sableux. Ces résultats peuvent être extrapolés aux autres cultures de cucurbitacées (concombre, courge, citrouille, cantaloup, melon, zucchini) puisque leur régie et leur mode de croissance sont comparables. Par ailleurs, étant donné que ce délai est basé sur le contenu microbiologique du sol, il peut servir d'indicateur pour les légumes racines et les tubercules tels que la carotte, le navet et la pomme de terre. Par contre, pour les cultures dont les produits ne sont pas en contact avec le sol (ex. chou et laitue), il est possible que le délai

puisse être abaissé, ce qui réduirait les contraintes d'épandage pour le producteur agricole. Cependant, les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ne nous permettent pas de conclure à ce sujet.

Il n'est pas toujours souhaitable de proposer un épandage précoce du lisier (quelques semaines avant les semis), particulièrement dans les cultures hâtives. En effet, un épandage de lisier de porcs très tôt au printemps pourrait entraîner un transport accru des nutriments du lisier vers les plans d'eau et un impact environnemental défavorable.

Dans des circonstances où le délai sécuritaire entre l'épandage et la récolte des produits ne peut être respecté, plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour réduire le risque pour l'homme. L'assainissement du lisier avant l'épandage est une première option. Cette approche présente plusieurs avantages. En diminuant la quantité de microorganismes pathogènes introduits au sol, elle réduit le risque de contamination des cultures. De plus, elle est bénéfique pour l'environnement puisque le risque de contamination microbienne des plans d'eau à proximité des champs fertilisés est diminué. L'entreposage du lisier, sans entrée de lisier frais, peut être proposé comme méthode d'assainissement.

Dans le cadre de cette étude, il a été démontré que, malgré les fluctuations de température du lisier entreposé dans les fosses commerciales au printemps, le déclin des populations de *E. coli* suit une décroissance exponentielle. Dans les conditions de cette étude, un entreposage d'une durée d'un mois au cours de la période d'avril à juin a permis d'obtenir une réduction d'au moins 90% des populations de *E. coli*. Ce délai ne garantit toutefois pas la disparition de *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica*. Une estimation du délai nécessaire pour éliminer *E. coli* peut être faite, par extrapolation, à l'aide de l'équation de régression obtenue pendant la période d'échantillonnage. Il est estimé à près de quatre mois. Il faut cependant

garder en tête que la durée d'entreposage nécessaire pour atteindre un niveau d'assainissement donné est influencée par la concentration initiale de microorganismes. Dans cette étude, les concentrations de *E. coli* variaient entre 2.9 et 4.6 log₁₀ UFC/g. De plus, la température influence grandement la survie. Donc, si l'entreposage se poursuit sur une partie de l'été (mois de juillet et août), la survie des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme sera réduite puisque la température du lisier augmentera (Munch *et al.*, 1987). Les conditions climatiques annuelles influenceront aussi la survie.

Une réduction importante des populations de *E. coli* peut donc être obtenue par un entreposage du lisier d'un mois. Cependant, cette stratégie n'élimine pas complètement *E. coli*, *Salmonella* et *Yersinia enterocolitica*. Par ailleurs, elle nécessite au moins deux structures d'entreposage, ce qui est plutôt rare sur les fermes québécoises. D'autres approches peuvent donc être envisagées, soient le respect d'un délai suffisant entre l'épandage du lisier de porcs et la récolte ou encore le traitement du lisier avant l'épandage.

Il est intéressant de faire l'exercice d'estimer l'impact qu'aurait eu un mois d'entreposage du lisier avant l'épandage dans les conditions de cette étude. Avec le lisier contenant 6.11 log₁₀ UFC/g de *E. coli*, le nombre de jours requis pour que les populations bactériennes se situent sous le seuil de détection dans le sol après l'épandage a été estimé à 56 jours. Si ce même lisier avait été préalablement entreposé pendant un mois avant l'épandage, la persistance dans le sol aurait été abaissée à 44 jours puisque la charge microbienne appliquée au sol aurait été réduite. En considérant un lisier épandu quelques jours avant le semis, des conditions sécuritaires auraient alors été rencontrées pour l'épandage du lisier dans la culture du cornichon.

Il demeure toutefois qu'il n'est pas toujours possible d'entreposer le lisier de porcs sans ajout de lisier frais, par manque de structures

d'entreposage. L'épandage du lisier non-assaini représente alors un risque potentiel, particulièrement dans les cultures hâtives dont la saison de croissance est courte. Les procédés de traitement du lisier de porcs peuvent alors devenir une solution.

La troisième partie de ce projet nous a permis de déterminer l'impact de la digestion anaérobie du lisier de porcs sur certains microorganismes potentiellement pathogènes pour l'humain. L'essai a été mené dans des bioréacteurs d'une capacité de 40 litres maintenus à une température de 20°C pendant 20 jours. Les populations de *E. coli* ont été réduites de 99,67 à 100%. De plus, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp. ont atteint des niveaux non-détectables suite au traitement. Cette technologie s'avère donc prometteuse pour assainir le lisier de porcs. Bien que son implantation engendre des coûts (variables selon l'entreprise), il est possible d'utiliser le méthane produit au cours du traitement à la ferme (Chynoweth *et al.*, 1999). De plus, cette technologie élimine les émissions gazeuses dommageables pour l'environnement.

Dans cette étude, l'efficacité de la digestion anaérobie a été mesurée à l'échelle du laboratoire. Selon Olsen et Larsen (1980), le potentiel de survie soumis à une digestion anaérobie mésophile fut comparable, tant à l'échelle du laboratoire qu'à grande échelle. Par contre, Kearny *et al.* (1993b) ont observé une persistance accrue des pathogènes dans des biodigesteurs anaérobies mésophiles de grand volume (210 m³), comparativement aux essais en laboratoire.

Les essais effectués dans le cadre de cette étude ont été menés en conditions de laboratoire. Il serait donc nécessaire dans le futur de préciser le pouvoir assainissant de cette technologie à l'échelle de la ferme dans les conditions du Québec. Si ces conditions permettent un assainissement équivalent aux essais de laboratoire, cela signifie que le délai de traitement

du lisier pourrait être réduit en utilisant la digestion anaérobie plutôt que l'entreposage seul.

Ces travaux de recherche ont permis de démontrer que, suite à l'utilisation de lisier de porcs pour fertiliser les légumes, des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme peuvent être présents dans le sol au moment des récoltes. Ceci pourrait se traduire par une exposition de l'homme si, par exemple, il y a contamination des légumes par le sol. Toutefois, les travaux ont permis d'identifier certains moyens de gérer ces dangers, soit par respect d'un délai sécuritaire entre l'épandage et la récolte ou encore l'assainissement du lisier avant l'épandage par son entreposage ou la digestion anaérobie.

Parmi les avenues possibles suite à cette étude, l'évaluation du potentiel de survie des MPPH dans différents types de sol apparaît nécessaire. Il semble en effet que cette variable influence grandement le potentiel de survie des microorganismes et le risque de contamination des produits qui peut y être associé.

CHAPITRE 7

CONCLUSIONS

Les résultats issus de cette étude ont permis d'accroître les connaissances sur le risque associé aux épandages d'engrais de ferme dans les cultures maraîchères, un domaine de recherche très peu développé au Québec et ailleurs dans le monde. La réalisation de ce projet a permis de démontrer que:

- Dans le contexte québécois, le contenu en *E. coli* du lisier de porcs destiné à l'épandage est très variable.
- Des microorganismes pathogènes pour l'homme tels que *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Cryptosporidium* spp. peuvent être présents dans le lisier destiné à l'épandage.
- Au Québec, l'entreposage du lisier de porcs dans des fosses commerciales (sans entrée de lisier frais) pendant 15 à 26 jours au printemps peut entraîner une diminution de 90% des populations de *E. coli* du lisier. Dans ces mêmes conditions, *Salmonella* spp. peut survivre pendant 88 jours.
- Dans un loam sableux, le nombre moyen de jours pour atteindre des niveaux non-détectables de *E. coli* dans le sol de surface suite à l'épandage de lisier de porcs peut atteindre 56 à 70 jours. La survie de *Salmonella* spp. dans ces conditions peut atteindre 54 jours.
- La digestion anaérobie du lisier de porcs est une méthode efficace pour détruire les microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme du lisier de porcs.

BIBLIOGRAPHIE

Abdul, P. and D. Lloyd. 1985. The survival of antibiotic resistant and sensitive *Escherichia coli* strains during anaerobic digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 373-377.

Abdul-Raouf, U. M., L. R. Beuchat and M. S. Ammar. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1999-2006.

Acha, P. N. and B. Szyfres. 1989. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Office international des épizooties, 2nd ed. 1063 p.

Ajariyakhajorn, C., S. M. Goyal, R. A. Robinson, L. J. Johnston and C. A. Clanton. 1997. The survival of *Salmonella* anatum, pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine slurry. *Microbiologica.* 20: 265-369.

Aleksic, S. and J. Bockemuhl. 1999. *Yersinia* and other *Enterobacteriaceae*. *In* Manual of clinical microbiology, 7th ed. American society for microbiology press. Murray, R. H., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Tenover (ed). 1325 Massachusetts Avenue, N. W., Washington, DC 20005. pp. 442-558.

APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Arbeit, R. D. 1999. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. *In* Manual of clinical microbiology, 7th ed. American society for microbiology press. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Tenover (ed). 1325 Massachusetts Avenue, N. W., Washington, DC 20005. pp. 116-137.

Baloda, S. B., L. Christensen and S. Trajcevska. 2001. Persistence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2859-2862.

Belkum, A. V., M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh and M. Tibayrenc. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 547-560.

Bendixen, H. J. 1994. Safeguards against pathogens in Danish biogas plants. *Wat. Sci. Tech.* 30: 171-180.

Beuchat, L. R. and J. Ryu. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 459-465.

Bogosonian, G., L. E. Sammons, P. J. L. Morris, J. P. O'Neil, M. A. Heitkamp, and D. B. Weber. 1996. Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4114-4120.

Bogosonian, G., P. J. Morris and J. P. O'Neil. 1998. A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1736-1742.

Bopp, C. A., F. W. Brenner, J. G. Wells and N.A. Strockbine. 1999. *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*. In *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American society for microbiology press. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Tenover. 1325 Massachusetts Avenue, N. W., Washington, DC 20005. pp. 442-558.

Bottone, E. J. 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. 10: 257-276.

Butler, T. 1994. *Yersinia* infections: centennial of the discovery of the plague bacillus. Clin. Infect. Dis. 19: 655-661.

Canadian Pork council (CPC). 2001. Statistics. Available online at <http://www.cpc-ccp.com/stats.html> (verified 28 oct. 2002). Canadian Pork Council, Ottawa, ON.

CEC, 1981. Communicable diseases resulting from storage, handling, transport, and land spreading of manures, ed. J. R. Walton and White, E. G.. Commission of the European Communities. Luxembourg: Office of Publications of the European Community.

Chapman, P. A., C. A. Siddons, J. Manning and C. Cheetham. 1997a. An outbreak of infection due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in four families: the influence of laboratory methods on the outcome of the investigation. Epidemiol. Infect. 119: 113-119.

Chapman, P. A., C. A. Siddons, A. T. Cerdan Malo and M. A. Harkin. 1997b. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol. Infect. 119: 245-250.

Choudhary, M., L. D. Bailey and C. A. Grant. 1996. Review of the use of swine manure in crop production effects on yield and composition and on soil and water quality. Waste Manag. Res. 14: 581-595.

Chynoweth, D. P., A. C. Wilkie, and J. M. Owens. 1999. Anaerobic treatment of piggery slurry. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 12: 607-628.

Cieslak, P. R., T. J. Barrett, P. M. Griffin, K. F. Gensheimer, G. Beckett, J. Buffington and M. G. Smith. 1993. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet*. 342: 367.

Comité de santé environnementale du Québec. 2000. Les risques à la santé associés aux activités de production animale au Québec. Document de référence produit pour le ministère de la santé et des services sociaux. 84 p.

Cools, D., R. Merckx, K. Vlassak and J. Verhaegen. 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl. Soil Ecol.* 17: 53-62.

CRAAQ (Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec). 2003. Guide de référence en fertilisation. 1st ed. CRAAQ.

Crane, S. R. and J. A. Moore. 1986. Modeling enteric bacterial die-off: a review. *Water Air Soil Poll.* 27: 411-439.

Curds, C. R. 1993. The role of protozoa in the activated-sludge process. *Am. Zool.* 13: 161-169.

D'Aoust, J., J. Maurer and J. S. Bailey. 2001. *Salmonella* species. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. American society for microbiology press. M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (ed). 1752 N Street, N.W., Washington, DC 20036-2904. pp. 141-178.

D'Aoust, J.-Y., D. W. Warburton and A. M. Sewell. 1985. *Salmonella* Typhimurium phage-type 10 from cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. *J. Food. Prot.* 48: 1062-1066.

Davies, P. R., W. E. M. Morrow, and F. T. Jones. 1997. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina. USA. *Epidemiol. Infect.* 119: 237-244.

Dazzo, F., P. Smith and D. Hubbell. 1973. The influence of manure slurry irrigation on the survival of fecal organisms in scranton fine sand. *J. Environ. Qual.* 2: 470-473.

Desrosiers, A., J. M. Fairbrother, R. P. Johson, C. Desautels, A. Letellier and S. Quessy. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* verotoxin-producing isolates from humans and pigs. *J. Food Prot.* 64: 1904-1911.

Duarte, E. A., B. Mendes, and J. S. Oliveira. 1992. Removal of *Salmonella*, *streptococci* and coliforms in pig breeding effluent by anaerobic mesophilic digestion. *Wat. Sci. Tech.* 26: 2169-2172.

DuPont, H. L., C. L. Chappell, C. R. Serling, P. C. Okhuysen, J. B. Rose, and W. Jakubowski. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332: 855-859.

Ekperigin, H.E. and K.V. Nagaraja. 1998. *Salmonella*. *Microbiol. Food. Path.* 14: 17-29.

Ercolani, G. L. 1997. Occurrence and persistence of culturable clostridial spores on the leaves of horticultural plants. *J. Appl. Microbiol.* 82: 137-140.

Farmer, J. J. 1999. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. *In* Manual of clinical microbiology, 7th ed. American society for microbiology press. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H.

Yolken. 1325 Massachussets Avenue, N. W., Washington, DC 20005. pp. 442-558.

Feder, I., F. M. Wallace, J. T. Gray, P. Fratamico, P. J. Fedorke-Cray, R. A. Pearce, J. E. Call, R. Perrine and J. B. Luchansky. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from fecal samples of swine. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 380-383.

Fédération des producteurs de porcs du Québec. 2004. Portrait de la production. <http://www.leporcduquebec.qc.ca/pages/Pages1H-b.html>.

Findlay, C. R. 1972. The persistence of *Salmonella* Dublin in slurry in tanks and on pasture. *Vet. Rec.* 91: 233-235.

Flemming, R., J. McLellon, D. Alves, D. Hilborn, K. Pintar and M. MacAlpine. 1997. *Cryptosporidium* in livestock, manure storages, and surface water in Ontario. Final report. 53 p.

Ginnivan, M.J., J. L. Woods and J. R. O'Callaghan. 1981. Thermophilic aerobic treatment of pig slurry. *J. Agric. Engng. Res.* 26: 455-466.

Guan, T. Y., and R. A. Holley. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness-a review. *J. Environ. Qual.* 32: 383-392.

Health Canada. 2001. Isolation of *E. coli* O157 in foods. Available online at <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment> (mars 2001).

Heinonen-Tanski, H., E. M. Niskanen, P. Salmela and E. Lankj. 1998. *Salmonella* in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperature. *J. Appl. Microbiol.* 85: 277-281.

Himathongkham, S., S. Bahari, H. Riemann and D. Cliver. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in cow manure and cow manure slurry. FEMS Microbiol. Lett. 178: 251-257.

IRDA (Institut de recherche et de développement en agroenvironnement). 2003. Mémoire de l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement inc. Commission sur le développement durable de la production porcine au Québec. 41 p.

Jack, E. J. and P. T. Hepper. 1969. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection in cattle associated with the spreading of slurry. Vet. Rec. 84: 196-199.

Jiang, X., J. Morgan and M. P. Doyle. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2605-2609.

Jones, P. W. 1980. Health hazards associated with the handling of animal wastes. Vet. Rec. 106 : 4-7.

Jones, P. W., G. S. Smith and J. Bew. 1977. The effect of the microflora in cattle slurry on the survival of *Salmonella* Dublin. Br. Vet. J. 133: 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: 284-296.

Johnston, L. J., C. J. Clanton, C. Ajariyakhajorn and S. M. Goyal. 2003. Survival of pathogenic indicator organisms in stored swine manure containing ground piglet carcasses during cold temperatures. Appl. Engng Agric. 19: 491-497.

Juris, P., F. Toth, A. Laukova, P. Plachy, P. Dubinsky and J. Sokol. 1996. Survival of model bacterial strains and helminth eggs in the course of mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Vet. Med. - Czech.* 5: 149-153.

Kapperud, G., S. Gustavsen, I. Hellenes, A. H. Hansen, J. Lassen, J. Hirn, M. Jahkola, M. A. montenegro and R. Helmuth. 1990. Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2597-2601.

Kaufmann, M. E. and T. L. Pitt. 1994. Pulse-field gel electrophoresis of bacterial DNA, chapter 8. *In* Chart, H. (ed.), *Methods in practical laboratory bacteriology*. CRC Press, London. UK.

Kearney, T. E., M. J. Larkin and P. N. Levett. 1993a. The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 86-93.

Kearny, T. E., M. J. Larkin, J. P. Frost and P. N. Levett. 1993b. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 215-219.

Kelly, W. R. 1978. Animal and human health hazards associated with the utilization of animal effluents. EUR 6009 EN. Brussels: Commission of the European Communities.

Kibbey, H. J., C. Hagedorn, and E. L. McCoy. 1978. Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 711-711.

Krieger, D. J., J. H. Bond and C. L. Barth. 1976. In Managing livestock wastes, Proc. 3rd Int. Symp. on livestock wastes. ASAE Pub. Proc.-275, St. Joseph, MI. p. 11.

Kudva, I. T., K. Blanch and C. J. Hovde. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3166-3174.

Kumar, R., M., K. Gupta and S. S. Kanwar. 1999. Fate of bacterial pathogens in cattle dung slurry subjected to anaerobic digestion. World J. Microbiol. Biotechnol. 15: 335-338.

Lammerding, A. M., M. M. Garcia, E. D. Mann, Y. Robinson, W. J. Dorward, R. B. Truscott, and F. Tittiger. 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal, and poultry in Canada. J. Food Prot. 51: 47-52.

Lejeune, J., T. E. Besser and D. D. Hancock. 2001. Cattle water trough as reservoirs of *Escherichia coli* O157. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3053-3057.

Letellier, A., S. Messier and S. Quessy. 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at canadian abattoirs. J. Food Prot. 62: 22-25.

Mallmann, W. L. and W. Litsky. 1951. Survival of selected enteric organisms in various types of soil. Am. J. Public Health. 41: 38-44.

Massé, D. I., N. K. Patni, R. L. Droste, and K. J. Kennedy. 1996. Operation strategies for psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. Can. J. Civ. Engin. 23: 1285-1294.

Massé, D. I., R. L. Droste, K. J. Kennedy, and N. K. Patni. 1997a. Potential for the psychrophilic anaerobic treatment of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Can. Agric. Engin. J.* 39: 25-33

Massé, D. I. and R. L. Droste, 1997b. Microbial interaction during anaerobic treatment of swine manure slurry in a sequencing batch reactor. *Can. Agric. Engin. J.* 39: 35-41.

Mawdsley, J. L., R. D. Bardgett, R. J. Merry, B. F. Pain and M. K. Theodourou. 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environment pollution. *Appl. Soil Ecol.* 2: 1-15.

Meng, J., M. P. Doyle, T. Zhao and S. Zhao. 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. American society for microbiology press. Doyle, M. P., L. R. Beuchat and T. J. Montville (ed). 1752 N Street, N.W., Washington, DC 20036-2904. pp. 193-213.

Meng, J. and M. P. Doyle. 1998. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bull. Instit. Pasteur.* 96: 151-164.

Mukherjee, A., D. Speh, E. Dyck and F. Diez-Gonzalez. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *J. Food Prot.* 67: 894-900.

Munch, B., H. E. Larsen and B. Aalbaek. 1987. Experimental studies on the survival of pathogenic and indicator bacteria in aerated and non-aerated cattle and pig slurry. *Biologic. Wastes.* 22: 49-65.

Natvig, E. E., S. C. Ingham, B. H. Ingham, L. R. Cooperband and T. R. Roper. 2002. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2737-2744.

N'Dayegamiye, A. and D. Côté. 1996. Effet d'application à long terme de fumier de bovins, de lisier de porcs et d'engrais minéral sur la teneur en matière organique et la structure du sol. *Agrosol* 9: 31-35.

Nicholson, R. J., J. Webb and A. Moore. 2002. A review of the environmental effects of different livestock manure storage systems, and a suggested procedure for assigning environmental ratings. *Biosyst. Engng.* 81: 363-377.

O'Donoghue, P. J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139-195.

Ogden, I. D., D. R. Fenlon, A. J. A. Vinten and D. Lewis. 2001. The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 66: 111-117.

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.

Olsen, J. E. and H. E. Larsen. 1987. Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biol. Wastes.* 21: 153-168

OMS (Organisation mondiale de la santé). 1998. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting, 23-26 juin 1998.

Ostling, C. E. and E. S. Lindgren. 1991. Bacteria in manure and on manured and NPK-fertilised crops. *J. Science Food Agricult.* 55: 579-588.

Pell, A. N. 1997. Manure and microbes: public and animal health problem ? *J. Dairy Sci.* 80: 2673-2681.

Pilon, J., R. Higgins and S. Quessy. 2000. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Quebec. *Can. Vet. J.* 41: 383-387.

Price, D. L. Procedure manual for the diagnosis of intestinal parasites. Boca Raton, Florida: CRC Pr, 1994. pp. 65-70.

Reddy, K. R., R. Khallel and M. R. Overcash. 1981. Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *J. Environ. Qual.* 10: 255-266.

Robins-Browne, R. M. 2001. *Yersinia enterocolitica*. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 2nd ed. American society for microbiology press. M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (ed). 1752 N Street, N.W., Washington, DC 20036-2904. pp. 215-245.

Rose, J. B., 1997. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Public Health.* 18: 135-161.

Roszak, D. B., D. J. Grimes and R. R. Colwell. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30: 334-338.

Ruest, N., G. M. Faubert, and Y. Couture. 1998. Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Québec. *Can. Vet. J.* 39: 697-700.

Schlech, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. High tower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308: 203-206.

Sewell, A. M. and J. M. Farber. 2001. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. J. Food Prot. 64: 1863-1877.

Shere, K. D., M. B. Goldberg and R. H. Rubin. 1998. *Salmonella* infections. In Infectious diseases. Gorbach, S. L., J. G. Bartlett and N. R. Blacklow (ed.), W.B. Saunders company, pp. 699-712.

Strauch, D. and G. Ballarini. 1994. Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. J. Vet. Med. B. 41: 176-228.

Tannock, G. W. and J. M. B. Smith. 1972. Studies on the survival of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella bovis-morbificans* on soil and sheep faeces. Res. Vet. Sci. 13: 150-153.

Tappouni, Y. A. 1984. The fate of *Salmonella* in anaerobic digestion. PhD Thesis. University college, Cardiff, UK.

Tate, R. L., 1978. Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols. Appl. Environ. Microbiol. 35 : 925-929.

Tauxe, R., H. Kruse, C. Hedberg, M. Potter, J. Madden and K. Wachsmuth. 1997a. Microbial hazards and emerging issues associated with produce In A preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic criteria for foods. J. Food Prot. 60: 1400-1408.

Tauxe, R. 1997b. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 425-434.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit and R. V. Goering. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 18: 426-439.

Topp, E., M. Welsh, Y. Tien, A. Dang, G. Lazarovits, K. Conn, and Hong Zhu. 2003. Strain-dependant variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 303-308.

Toranzos, G. A., G. A. McFeters and J. J. Borrego. 2002. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. *In* Manual of environmental microbiology. 2nd ed. American society for microbiology press. Hurst, C. J., R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (ed). 1752 N Street, N.W., Washington, DC 20036-2904. pp. 193-213.

Tran, T. S., D. Côté and A. N'Dayegamiye. 1996. Effets des apports prolongés de fumier et de lisier sur l'évolution des teneurs du sol en éléments nutritifs majeurs et mineurs. *Agrosol* 9: 21-30.

Trevisan, D., J. Y. Vansteelant and J. M. Dorioz. 2002. Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res.* 36: 275-283.

Turpin, P. E., K. A. Maycroft, C. L. Rowlands and E. M. H. Wellington. 1993. Viable but non-culturable salmonellas in soils. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 421-427.

Villeneuve, A. 2003. Les zoonoses parasitaires. Les presses de l'Université de Montréal. 499 pages.

Wessendorf, J. and F. Lingens. 1989. Effect of culture and soil conditions on survival of *Pseudomonas fluorescens* R1 in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 97-102.

Yates, M. V. and S. R. Yates. 1988. Modeling microbial fate in the subsurface environment. Critic. Rev. Environ. Control. 17: 307-344.

Weiss, J. S. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 29: 29-32.

Welshimer, H. J. 1968. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. J. Bacteriol. 95: 300-303.

Winter, J. and F. X. Wildenauer. 1984. Comparison of volatile acid turnover during improved digestion of sewage sludge, cattle manure, and piggery wastes. Third European Congress of Biotechnology, Munchen, Germany. Weinheim. 3: 81-87.

Zibilske, L. M. and R. W. Weaver. 1978. Effect of environmental factors on survival of *Salmonella* Typhimurium in soil. J. Environ. Qual. 7: 593-597.

Caroline Cote

From: Spencer, Diana (ELS) [REDACTED]
Sent: April 28, 2005 6:24 AM
To: 'Caroline Cote'
Subject: RE: Article in bioresource technology

Dear Caroline

I confirm that you are permitted to use the article "Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries" by Caroline Côté, Daniel I. Massé and Sylvain Quessy in your thesis entitled "Impact des épandages d'engrais de ferme dans les cultures maraîchères".

With best wishes

Diana

Diana Spencer
Editorial Assistant - Energy
Elsevier Ltd

Tel: +44 1865 843372
Fax: +44 1865 843987
[REDACTED]

www.elsevier.com

-----Original Message-----

From: Caroline Cote [REDACTED]
Sent: 26 April 2005 19:55

[REDACTED]
Subject: Article in bioresource technology

Dear Mrs Spencer,

I have recently submitted an article for publication in Bioresource technology (ref. BRT 03-218). It will be published within 6-9 months. I would like to include this article to my PhD thesis, and I need your approval. If you agree with that, could you please send me an E-mail confirming your acceptance including the following informations:

Title: Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries.

Authors: 1 Caroline Côté *, 2 Daniel I. Massé and 3 Sylvain Quessy
Periodic : Bioresource technology

Thesis title: Impact des épandages d'engrais de ferme dans les cultures maraîchères.

Thank you very much

2005-04-28

Caroline Côté

It is fine with me but you must contact the publishing office.

SC Ricke-editor

Their contact information is:

Diana Spencer

Editorial Assistant, Energy

Materials Science and Engineering

Elsevier Ltd, The Boulevard, Langford Lane

Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK

Tel: +44 1865 843372

Fax: +44 1865 843987

Heather Johnstone, PhD

Senior Publishing Editor - Energy

Elsevier Ltd

Tel: +44 (0)1865 843887

Fax: +44 (0)1865 843920

www.elsevier.com <<http://www.elsevier.com>>

www.sciencedirect.com <<http://www.sciencedirect.com>>

ELSEVIER B.V.
TRANSFER OF COPYRIGHT AGREEMENT

Journal publishers and authors share a common interest in the protection of copyright: authors principally because they want their creative works to be protected from plagiarism and other unlawful uses, publishers because they need to protect their work and investment in the production, marketing and distribution of the published version of the article. In order to do so effectively, publishers request a formal written transfer of copyright from the author(s) for each article published. Publishers and authors are also concerned that the integrity of the official record of publication of an article (once refereed and published) be maintained, and in order to protect that reference value and validation process, we ask that authors recognize that distribution (including through the Internet/WWW or other on-line means) of the authoritative version of the article as published is best administered by the Publisher.

To avoid any delay in the publication of your article, please read the terms of this agreement, sign in the space provided and return the complete form to us at the address below as quickly as possible.

Article entitled: Fate of pathogenic and non pathogenic microorganisms during storage of liquid hog manure in Quebec

Corresponding author: Dr. Caroline Cote

To be published in the journal: Livestock Science

I hereby assign to Elsevier B.V.

the copyright in the manuscript identified above and any supplemental tables, illustrations or other information submitted therewith (the "article") in all forms and media (whether now known or hereafter developed), throughout the world, in all languages, for the full term of copyright and all extensions and renewals thereof, effective when and if the article is accepted for publication. This transfer includes the right to adapt the presentation of the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in electronic retrieval systems.

Authors retain or are hereby granted (without the need to obtain further permission) rights to use the article for traditional scholarship communications, for teaching, and for distribution within their institution, as set out in the General Terms of Publication (see note 1), and also agree to the other terms.

- I am the sole author of the manuscript
- I am one author signing on behalf of all co-authors of the manuscript
- The article is a 'work made for hire' and I am signing as an authorized representative of the employing company
- I am a US Government employee and there is no copyright to transfer, but I affirm the author warranties (see notes 3 and 4)
- I am a co-author who is not a US Government employee but whose co-authors are government employees (see note 4)
- I am an employee of the UK, Canadian or Australian Government claiming Crown Copyright, but I affirm the author warranties (see note 5)
- I am a co-author who is not claiming Crown Copyright but whose co-authors are employees of the UK, Canadian or Australian Government (see note 5)

Please mark **one or more** of the above boxes (as appropriate) and then sign and date the document in black ink.

Signed: [redacted] Name printed: Caroline Côté

Title and Company (if employer representative): researcher, IRDA

Date: 27 mars 2006

Data Protection: By submitting this form you are consenting that the personal information provided herein may be used by Elsevier Ltd. and its affiliated companies worldwide to contact you concerning the publishing of your article and occasionally for marketing purposes. We respect your privacy. If you do NOT wish to receive news, promotions and special offers about our products and services, then please mark this box []. See also the Elsevier website at <http://www.elsevier.com> and click *Privacy Policy*.

Please return the completed and signed original of this form by mail or fax, or a scanned copy of the signed original by e-mail, retaining a copy for your files, to:

Elsevier Shannon
Editorial-Production Department
Livestock Science

Brookvale Plaze, East Park
Shannon, Co Clare
Ireland
Fax: +353 61 709114

PII: S1871-1413(06)00100-4
LIVSCI|54

General Terms of Publication

1. As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use;
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g. via an e-mail list or list server);
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites;
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com);
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such meeting;
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g. training);
- retain patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the article;
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially);
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of the article in the journal); and
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.

All copies, print or electronic, or other use of the paper or article must include the appropriate bibliographic citation for the article's publication in the journal. See note 7 concerning posting related to the National Institutes of Health ("NIH") voluntary posting request policy (referred to as the NIH "Public Access Policy").

2. Requests from third parties

Requests for all uses not included above, including the authorization of third parties to reproduce or otherwise use all or part of the article (including figures and tables), should be referred to the Elsevier Global Rights Department by going to our website at <http://www.elsevier.com/locate/permissions> and selecting 'Permissions'. See note 7 re posting in connection with the NIH "Public Access Policy".

3. Author warranties

- The article you have submitted to the journal for review is original, has been written by the stated authors and has not been published elsewhere.
- The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under review by the journal.
- The article contains no libellous or other unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights of any other person or entity.
- You have obtained written permission from copyright owners for any excerpts from copyrighted works that are included and have credited the sources in your article.
- If the article was prepared jointly with other authors, you have informed the co-author(s) of the terms of this copyright transfer and that you are signing on their behalf as their agent, and represent that you are authorized to do so.

4. US Government employees

- If all co-authors are US Government employees there is no copyright to transfer. Please sign the form, to confirm the author warranties.
- If there is a number of co-authors, of which at least one is a US Government employee (and this work was prepared in such capacity) and at least one is not a government employee, the non-government author should sign this form, indicating transfer of those rights which such author has (also on behalf of any other non-government co-authors).

5. Crown Copyright

- UK Government employee authors may elect to transfer copyright.
- UK Government employees wishing to claim Crown Copyright should mark the appropriate box overleaf, sign the form to affirm the author warranties and attach the completed authorization form as per HMSO guidelines at <http://www.hmso.gov.uk/copyright/guidance/articles/htm>.
- The work of Canadian or Australian Government employees is automatically subject to Crown Copyright. Please mark the appropriate box and sign the form to affirm the author warranties.
- If there is a number of co-authors, of which at least one is claiming Crown Copyright and at least one is not an employee of the UK, Canadian or Australian Government, the non-government author should sign this form, indicating transfer of those rights which such author has (also on behalf of any other non-government co-authors).

6. Elsevier's AiP (Articles in Press) service

Elsevier may choose to publish an abstract or portions of the paper before we publish it in the journal. Please contact our Production department immediately if you do not want us to make any such prior publication for any reason, including disclosure of a patentable invention.

7. US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting/ "Public Access Policy"

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov/>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please email us at NIHauthorrequest@elsevier.com that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and posted by US government employees should be taken down from PMC). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant	
Caroline CÔTÉ	
Titre du programme	Microbiologie
Ph.D.	Sciences vétérinaires

DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs	
Caroline Côté et Sylvain Quessy	
Titre	
Persistence of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella</i> in the surface soil following liquid hog manure spreading in the production of pickling cucumber	
Revue	Sous presse
Journal of Food Protection	
Auteurs	
Caroline Côté, Daniel Massé et Sylvain Quessy	
Titre	
Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries	
Revue	Accepté
Bioresource Technology	
Auteurs	
Caroline Côté, Louise Lessard, Alain Villeneuve et Sylvain Quessy	
Titre	
Fate of indicator and pathogenic microorganisms in liquid hog manure during storage	
Revue	En préparation

DÉCLARATION DES COAUTEURS

À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Caroline CÔTÉ inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Risques biologiques associées aux épandages d'engrais de ferme dans les cultures maraîchères

Coauteur	Date
Louise Lessard	25/04/05
Coauteur	Date
Daniel Massé	25/04/05
Coauteur	Date
Sylvain Quessy	25/04/05
Coauteur	Date
Alain Villeneuve	25/04/05

Tableau AII. Code génétique et alphabet pour l'encodage des bases dégénérées

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F)	TCT Ser (S)	TAT Tyr (Y)	TGT Cys (C)
	TTC	TCC	TAC	TGC
	TTA Leu (L)	TCA	TAA arrêt	TGA arrêt
	TTG	TCG	TAG arrêt	TGG Trp
C	CTT Leu (L)	CCT Pro (P)	CAT His (H)	CGT Arg (R)
	CTC	CCC	CAC	CGC
	CTA	CCA	CAA Gln (Q)	CGA
	CTG	CCG	CAG	CGG
A	ATT Ile (I)	ACT Thr (T)	AAT Asn (N)	AGT Ser (S)
	ATC	ACC	AAC	AGC
	ATA	ACA	AAA Lys (K)	AGA Arg (R)
	ATG Met (M)	ACG	AAG	AGG
G	GTT Val (V)	GCT Ala (A)	GAT Asp (D)	GGT Gly (G)
	GTC	GCC	GAC	GGC
	GTA	GCA	GAA Glu (E)	GGA
	GTG	GCG	GAG	GGG

B= C, G ou T; **D**= A, G ou T; **H**= A, C ou T; **K**= G ou T; **M**= A ou C; **N**= A, C, G ou T;

R= A ou G; **S**= C ou G; **V**= A, C ou G; **W**= A ou T; **Y**= C ou T.