

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

1998

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE ET SANTE »

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 16 mars 1998

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I
Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

par

Laurence THIRIAT

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Chimie et Microbiologie de l'Eau

Sujet :

**Valorisation agricole des boues résiduaires :
dénombrement des kystes de *Giardia* sp. et estimation de
leur impact sur le risque sanitaire**

MEMBRES DU JURY

Juges Mr WIART J. (ADEME, Angers)
 Dr BONNIN C. (Anjou Recherche, Maisons Lafitte)
 Pr SCHWARTZBROD J. (UHP, Nancy)
 Mr EHRHARDT J.J. (LCPE, Nancy)

Rapporteurs Pr BOUCHET F. (Université de Reims)
 Pr BONTOUX J. (Université de Montpellier I)



INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. LE PROTOZOAIRE PARASITE.....	3
1.1. <i>Taxonomie.....</i>	3
1.2. <i>Morphologie et cycle.....</i>	4
1.3. <i>Transmission.....</i>	10
1.3.1. Dose minimale infectante (DMI).....	10
1.3.2. Voies de transmission.....	10
1.3.2.1. Mode direct.....	11
1.3.2.2. Mode indirect.....	12
1.4. <i>Clinique et traitement.....</i>	13
1.4.1. Pathologie.....	13
1.4.2. Réponse immunitaire.....	14
1.4.3. Diagnostic.....	15
1.4.3.1. Examen direct des selles.....	15
1.4.3.2. Methodes immunologiques appliquées aux selles.....	16
1.4.3.3. Diagnostics a partir d'autres prélèvements.....	18
1.4.4. Traitement.....	19
1.4.5. Prévention.....	20
1.5. <i>Epidémiologie.....</i>	21
1.5.1. Réservoirs de germes et prévalence.....	21
1.5.1.1. Réservoirs de germes.....	21
1.5.1.2. Prévalence.....	22
1.1.1. Epidémies.....	28
1.1.1.1. Epidémies d'origine hydrique.....	28
1.1.1.2. Epidémies d'origine alimentaire.....	31
1.1.2. Variations saisonnières.....	31
1.1.3. Niveau de contamination du milieu hydrique - eaux et boues résiduaires.....	32
1.1.3.1. Eaux de surface.....	32
1.1.3.2. Eaux usées.....	33
1.1.1.1. Boues résiduaires.....	43
1.1.1. Modélisation des risques.....	46
1.1.1.1. Risque lié a la consommation d'eau de boisson.....	46
1.1.1.2. Risque lié a l'ingestion d'eaux recyclées ou de boues.....	47
1.1.2. Indicateurs de contamination.....	48
1.2. <i>Impact de différents paramètres.....</i>	49
1.2.1. Rôle de la température et du temps.....	49
1.1.1. Performances des principaux systèmes de désinfection.....	52
1.1.1.1. Chlore et produits dérivés.....	52
1.1.1.2. Autres dérivés halogénés.....	54
1.1.1.3. Ozone et produits dérivés.....	55
1.1.1.4. Radiations U.V.....	56
1.1.1.5. Filtration.....	56
1.1.1.6. Microfiltration, ultrafiltration et osmose inverse.....	58
1.1.1.7. Autres systèmes de désinfection.....	58
1.1.2. Impact des réactifs de conservation et de concentration.....	58
1.1.2.1. Réactifs de conservation.....	58
1.1.2.2. Réactifs de concentration.....	59
1.1.3. Rôle des conditions environnementales.....	61
1.1.3.1. Eaux.....	61
1.1.3.2. Selles.....	62
1.1.3.3. Effluents.....	62
2. BOUES ET TRAITEMENTS D'EPURATION.....	63
2.1. <i>Les différents types de boues produits par les stations d'épuration.....</i>	63
2.1.1. Les différents types de stations d'épuration.....	63
2.1.1.1. Les stations d'épuration biologiques.....	63
2.1.1.2. Les stations d'épuration physico-chimiques.....	63
2.1.2. Stabilisation des boues.....	63
2.1.2.1. Stabilisation biologique.....	63
2.1.2.2. Stabilisation chimique.....	64
2.1.2.3. Stabilisation thermique.....	64
2.1.3. Réduction de la teneur en eau des boues.....	65
2.1.3.1. Epaissement.....	65
2.1.3.2. Déshydratation.....	65

2.1.3.3. Sechage	65
2.1.4. Traitements tertiaires	65
2.1.5. Désignation des différents types de boues	66
2.2. Production et modes d'élimination des boues	68
2.3. Epannage des boues	70
2.3.1. Les risques associés à l'épannage	70
2.3.2. Cadre réglementaire	73
2.3.2.1. Echelon européen	73
2.3.2.2. Echelon français	74
2.3.3. Interface assainissement-monde agricole	75
3. PURIFICATION-CONCENTRATION ET EVALUATION DE LA VIABILITE DES KYSTES	76
3.1. Sources de kystes	76
3.1.1. Production sur l'animal	76
3.1.2. Culture in vitro	76
3.1.2.1. Trophozoïtes	76
3.1.2.2. Kystes	77
3.2. Méthodes de purification-concentration des kystes à partir de selles	78
3.3. Méthodes de purification-concentration des kystes à partir d'eaux	80
3.4. Méthodes de purification-concentration des kystes à partir d'eaux usées	81
3.5. Méthodes de purification-concentration des kystes à partir de boues résiduaires	82
3.6. Détection et dénombrement des kystes	83
3.6.1. Les différentes méthodes de détection-quantification	83
3.6.1.1. Détection par microscopie photomique	84
3.6.1.2. Détection par immunofluorescence	84
3.6.1.3. Détection par biologie moléculaire	85
3.6.1.4. Détection par capture immunomagnétique	86
3.6.1.5. Détection par ELISA	86
3.6.1.6. Détection par spectroscopie UV-VIS	86
3.6.1.7. Détection par cytométrie de flux	86
3.6.1.8. Détection par électrorotation	86
3.6.1.9. Evaluation des performances	87
3.6.2. Les interférences	87
3.7. Evaluation de la viabilité des kystes	89
3.7.1. Les différentes méthodes	89
3.7.1.1. Colorants fluorogènes	89
3.7.1.2. Dékystement	90
3.7.1.3. Inoculation à l'animal	92
3.7.1.4. Morphologie	92
3.7.1.5. Electrorotation	93
3.7.1.6. Biologie moléculaire	93
3.7.1.7. Associations de méthodes	94
3.7.2. Comparaison des méthodes	95
3.7.2.1. Exclusion à l'éosine-dékystement	95
3.7.2.2. Inoculation à l'animal-dékystement	95
3.7.2.3. Morphologie-dékystement	95
3.7.2.4. Exclusion à l'éosine-inoculation à l'animal	96
3.7.2.5. FDA/PI-inoculation à l'animal	96
3.7.2.6. FDA/PI-morphologie	96
3.7.2.7. FDA/PI-dékystement	96
3.7.2.8. PI-inoculation à l'animal	97
3.7.2.9. PI-RT-PCR	97
3.7.2.10. FDA/BE-dékystement-inoculation à l'animal	97
3.7.2.11. PI-dékystement	97
3.7.2.12. Colorants d'acides nucléiques-dékystement-inoculation à l'animal	98

RESULTATS 99

1. ELABORATION DE PROTOCOLES DE PURIFICATION-CONCENTRATION ET D'EVALUATION DE LA VIABILITE DES KYSTES DE <i>GLARDA</i>	99
1.1. Préparation d'un stock de kystes	99
1.1.1. Matériels	99
1.1.2. Résultats	101
1.1.2.1. Choix de la méthode de purification-concentration	101
1.1.2.1.1. Mise au point de la technique par flottation au saccharose	102
1.1.2.1.2. Mise au point de la technique de chromatographie gel filtration	104
1.1.2.1.3. Performances des deux méthodes	108
1.1.2.2. Choix de la méthode de quantification	110

1.1.3. Conclusion-discussion	111
1.2. Mise au point d'une méthode de purification-concentration des kystes de <i>Giardia</i> à partir de boues.....	112
1.2.1. Matériels.....	112
1.2.2. Méthodes.....	114
1.2.2.1. Méthode B+F	114
1.2.2.2. Immunofluorescence directe.....	114
1.2.2.3. Méthode de Soares & al. (1994) modifiée.....	115
1.2.2.4. Test statistique.....	116
1.2.3. Résultats.....	116
1.2.3.1. Etude préliminaire.....	116
1.2.3.1.1. Choix des méthodes.....	116
1.2.3.1.2. Tests de comparaison.....	117
1.2.3.2. Mise au point de la chromatographie gel filtration pour des échantillons de boues.....	119
1.2.3.2.1. Concentration.....	119
1.2.3.2.2. Chromatographie gel filtration.....	120
1.2.3.2.3. Quantification.....	122
1.2.3.2.4. Impact d'une étape supplémentaire.....	122
1.2.3.3. Détermination du rendement.....	126
1.2.3.3.1. Impact des étapes de préparation.....	127
1.2.3.3.2. Impact de la chromatographie gel filtration.....	127
1.2.3.3.3. Rendement global.....	129
1.2.4. Conclusion-Discussion.....	134
1.3. Adaptation d'un protocole d'évaluation de la viabilité dans les boues.....	135
1.3.1. Matériels.....	135
1.3.2. Méthodes.....	136
1.3.3. Résultats.....	137
1.3.3.1. Choix de la méthode d'évaluation de la viabilité.....	137
1.3.3.1.1. Choix et mode d'utilisation des colorants.....	139
1.3.3.1.2. Adaptation des techniques de lecture.....	139
1.3.3.1.3. Rôle du paramètre temps.....	140
1.3.3.1.4. Critères de reconnaissance.....	143
1.3.3.1.5. Valeur de la technique retenue.....	145
1.3.3.2. Evaluation de la méthode FCIS.....	147
1.3.3.2.1. Evaluation de la méthode FCIS sur boues primaires.....	148
1.3.3.2.2. Evaluation de la méthode FCIS sur boues digérées.....	150
1.3.3.2.3. Evaluation de la méthode FCIS sur 23 types de boues.....	152
1.3.3.2.4. Difficultés liées à l'identification.....	156
1.3.4. Conclusion-discussion.....	162
2. ETUDE SUR LE TERRAIN.....	163
2.1. Matériels et méthodes.....	163
2.1.1. Les 10 stations d'épuration.....	165
2.1.2. Rythme de prélèvement.....	170
2.1.3. Conditions de stockage.....	170
2.1.4. Survie des kystes.....	171
2.1.5. Protocoles d'étude de l'impact des ferrates.....	171
2.1.6. Méthodes d'analyse.....	172
2.1.7. Expression des résultats.....	172
2.1.8. Tests statistiques.....	173
2.2. Résultats.....	173
2.2.1. Niveau de contamination en kystes de <i>Giardia</i>	173
2.2.2. Viabilité des kystes dans les boues.....	176
2.2.3. Variations saisonnières.....	177
2.2.4. Impact des traitements d'épuration des boues.....	178
2.2.4.1. Aération prolongée.....	179
2.2.4.2. Digestion anaérobie mésophile.....	180
2.2.4.3. Lagunage.....	182
2.2.4.4. Digestion aérobie thermophile.....	183
2.2.4.5. Stabilisation aérobie mésophile.....	184
2.2.4.6. Chaulage par chaux vive.....	185
2.2.4.7. Chaulage par chaux éteinte et chlorure ferrique.....	186
2.2.4.8. Séchage thermique.....	187
2.2.4.9. Compostage.....	188
2.2.4.10. Conclusions sur l'impact des traitements.....	189
2.2.5. Effet du stockage.....	189
2.2.5.1. Stockage statique en extérieur.....	189
2.2.5.2. Stockage statique à 4°C au laboratoire.....	191

2.2.5.3. Stockage sous agitation au laboratoire.....	192
2.2.5.4. Conclusions sur le stockage.....	193
2.2.6. Impact d'un désinfectant.....	194
2.2.6.1. Effet pH des ferrates.....	194
2.2.6.2. Impact des ferrates sur les kystes de Giardia dans les boues.....	195
2.2.6.2.1. Impact des ferrates avec contamination artificielle des boues.....	195
2.2.6.2.2. Impact des ferrates sans contamination artificielle des boues.....	196
2.2.6.3. Impact des ferrates sur les kystes dans l'eau désionisée.....	198
2.3. Conclusion-discussion.....	200
CONCLUSION.....	202
BIBLIOGRAPHIE.....	206
ANNEXES.....	238
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	254
