



THESE



Présentée et soutenue publiquement
le 16 mars 1998

pour obtenir le titre de

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

par

Laurence THIRIAT

Titulaire du Diplome d'Etudes Approfondies
Chimie et hclicrobiologie de l'Eau

Sujet

**Valorisation agricole des boues résiduaaires :
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 1)

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. LE PROTOZOAIRE PARASITE	3
1.1 <i>Taxonomie</i>	3
1.1.1 <i>Morphologie et cycle</i>	4
1.2 <i>Transmission</i>	10
1.2.1 <i>Dose infectieuse (DMI)</i>	10
1.2.2 <i>voies de transmission</i>	10
1.2.2.1 <i>Mode direct</i>	11
1.2.2.2 <i>Mode indirect</i>	12
1.4 <i>Clinique et traitement</i>	13
1.4.1 <i>Pathologie</i>	13
1.4.2 <i>Réponse immunitaire</i>	14
1.4.3 <i>Diagnostic</i>	15
1.4.3.1 <i>Examen direct des selles</i>	15
1.4.3.2 <i>Méthodes immunologiques appliquées aux selles</i>	16
1.4.3.3 <i>Méthodes de diagnostic à partir d'autres prélèvements</i>	16
1.4.4 <i>Traitement</i>	19
1.4.5 <i>Prévention</i>	20
1.5 <i>Epidémiologie</i>	21
1.5.1 <i>Reservoirs de germes et prévalence</i>	21
1.5.1.1 <i>Reservoirs de germes</i>	21
1.5.1.2 <i>Prévalence</i>	21
1.5.2 <i>Epidémies</i>	28
1.5.2.1 <i>Epidémies d'origine hydrique</i>	28
1.5.2.2 <i>Epidémies d'origine alimentaire</i>	31
1.5.3 <i>Variations saisonnières</i>	31
1.5.4 <i>Niveau de contamination des milieux hydriques : eaux et effluents résiduaires</i>	32
1.5.4.1 <i>Eaux de surface</i>	32
1.5.4.2 <i>Eaux usées</i>	33
1.5.4.2.1 <i>Boues résiduaires</i>	43
1.5.5 <i>Modélisation des risques</i>	40
1.5.5.1 <i>Risque lié à la consommation d'eau de boisson</i>	40
1.5.5.2 <i>Risque lié à l'usage d'eaux recyclées ou de boîtes</i>	40
1.5.6 <i>Indicateurs de contamination</i>	48
1.2 <i>Impact de différents paramètres</i>	49
1.2.1 <i>Kinétique de température et de temps</i>	49
1.2.2 <i>Performances des principaux systèmes de désinfection</i>	52
1.2.2.1 <i>Chlore et produits dérivés</i>	52
1.2.2.2 <i>Amalgams dérivés halogénés</i>	54
1.2.2.3 <i>Ozone et produits dérivés</i>	57
1.2.2.4 <i>Radiations UV</i>	56
1.2.2.5 <i>Filtration</i>	56
1.2.2.6 <i>Microfiltration, ultrafiltration et osmose inverse</i>	58
1.2.3 <i>Autres systèmes de désinfection</i>	58
1.2.4 <i>Impact des rejets de conservation et de concentration</i>	58
1.2.4.1 <i>Reactifs de conservation</i>	58
1.2.4.2 <i>Reactifs de concentration</i>	59
1.2.5 <i>Rôle des conditions environnementales</i>	61
1.2.5.1 <i>Eaux</i>	61
1.2.5.2 <i>Selles</i>	62
1.2.5.3 <i>Effluents</i>	65
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 <i>Les différents types de stations d'épuration</i>	63
2.1.1.1 <i>Les stations d'épuration biologiques</i>	63
2.1.1.2 <i>Les stations d'épuration physico-chimiques</i>	63
2.1.2 <i>Stabilisation des boues</i>	63
2.1.2.1 <i>Stabilisation biologique</i>	63
2.1.2.2 <i>Stabilisation chimique</i>	64
2.1.2.3 <i>Stabilisation thermique</i>	64
2.1.3 <i>Méthodes de la teneur en eau des boues</i>	65
2.1.3.1 <i>Épaississement</i>	65
2.1.3.2 <i>Déshydratation</i>	66

2.1.3.3. Sechage.....	65
2.1.4. Traitements tertiaires.....	65
2.1.5. Designation des differents types de boues.....	66
2.2. Production et modes d'elimination des boues.....	68
2.3. Epandage des boues.....	70
2.3.1. Les risques associes a l'epandage.....	70
2.3.2. Cadre reglementaire.....	73
2.3.2.1. Echelon europeen.....	73
2.3.2.2. Echelon francais.....	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. Trophozoites.....	76
3.1.2.2. Kystes.....	77
3.2. Methodes de purification-concentration des kystes a partir de selles.....	78
3.3. Methodes de purification-concentration des kystes a partir d'eaux.....	80
3.4. Methodes de purification-concentration des kystes a partir d'eaux usees.....	81
3.5. Methodes de purification-concentration des kystes a partir de boues residuaires.....	82
3.6. Detection et denombrement des kystes.....	83
3.6.1. Les differentes methodes de detection-quantification.....	83
3.6.1.1. Detection par microscopie photomique.....	84
3.6.1.2. Detection par immunofluorescence.....	84
3.6.1.3. Detection par biologie moleculaire.....	85
3.6.1.4. Detection par capture immunomagnetique.....	86
3.6.1.5. Detection par ELISA.....	86
3.6.1.6. Detection par spectroscopie UV-VIS.....	86
3.6.1.7. Detection par cytometrie de flux.....	86
3.6.1.8. Detection par electrorotation.....	86
3.6.1.9. Evaluation des performances.....	87
3.6.2. Les interferences.....	87
3.7. Evaluation de la viabilite des kystes.....	89
3.7.1. Les differentes methodes.....	89
3.7.1.1. Colorants fluorogeniques.....	89
3.7.1.2. Dekystement.....	90
3.7.1.3. Inoculation a l'animal.....	92
3.7.1.4. Morphologie.....	92
3.7.1.5. Electrorotation.....	93
3.7.1.6. Biologie moleculaire.....	93
3.7.1.7. Associations de methodes.....	94
3.7.2. Comparaison des methodes.....	95
3.7.2.1. Exclusion a l'eosine-dekystement.....	95
3.7.2.2. Inoculation a l'animal-dekystement.....	95
3.7.2.3. Morphologie-dekystement.....	95
3.7.2.4. Exclusion a l'eosine-inoculation a l'animal.....	96
3.7.2.5. FDA/PI-inoculation a l'animal.....	96
3.7.2.6. FDA/PI-morphologie.....	96
3.7.2.7. FDA/PI-dekystement.....	96
3.7.2.8. PI-inoculation a l'animal.....	97
3.7.2.9. PI-RT-PCR.....	97
3.7.2.10. FDA/BF-dekystement-inoculation a l'animal.....	97
3.7.2.11. PI-dekystement.....	97
3.7.2.12. Colorants d'acides nucleiques-dekystement-inoculation a l'animal.....	98

RESULTATS 99

I ELABORATION DE PROTOCOLES DE PURIFICATION-CONCENTRATION ET D'EVALUATION DE LA VIABILITE

DIS H S 11 S DI GIARDI.....	99
1.1. Preparation d'un stock de kystes.....	99
1.1.1. Materiel.....	00
1.1.2. Resultats.....	101
1.1.3. Choix de la methode de purification-concentration.....	101
1.1.3.1. Mise au point de la methode de purification par flottation au saccharose.....	102
1.1.3.2. Mise au point de la methode de purification par chromatographie gel filtratif.....	104
1.1.3.3. Performances des deux methodes.....	108
1.1.4. Choix de la methode de quantification.....	110

1 1 3 Conclusion-discussion	111
12 Mise en parallèle d'une méthode de purification-concentration des kystes de <i>Giardia</i> à partir de boues	112
12 1 Matériels	112
12 2 Méthodes	114
12 2 1 Méthode B+F	114
12 2 2 Immunofluorescence directe	114
12 2 3 Méthode de Soares & al (1994) modifiée	115
12 2 4 Test statistique	116
12 3 Résultats	116
12 3 1 Etude préliminaire	116
12 3 1 1 Clonage des kystes	116
12 3 1 2 Tests de comparaison	117
12 3 2 Mise au point de la chromatographie gel filtration pour des échantillons de boues	119
12 3 2 1 Concentration	119
12 3 2 2 Chromatographie gel filtration	120
12 3 2 3 Quantification	122
12 3 2 4 Impact d'une étape supplémentaire	122
12 3 3 Détermination du rendement	126
12 3 3 1 Impact des étapes de préparation	126
12 3 3 2 Impact de la chromatographie gel filtration	127
12 3 3 3 Rendement global	129
12 4 Conclusion-Discussion	134
1 3 Adaptation et validation 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 Évaluation de la méthode FCIS	147
1 3 3 2 1 Évaluation de la méthode FCIS sur boues primaires	148
1 3 3 2 2 Évaluation de la méthode FCIS sur boues digérées	150
1 3 3 2 3 Évaluation 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.....	17
2.2.5.4. Conclusions sur le stockage.....	18
2.2.6. Impact d'un désinfectant.....	18
2.2.6.1. Effet pH des ferrates.....	18
2.2.6.2. Impact des ferrates sur les kystes de Giardia dans les boues.....	18
2.2.6.2.1. Impact des ferrates avec contamination artificielle des boues.....	18
2.2.6.2.2. Impact des ferrates sans contamination artificielle des boues.....	19
2.2.6.3. Impact des ferrates sur les kystes dans l'eau desionisee.....	19
2.3. Conclusion-discussion.....	20
CONCLUSION.....	20
BIBLIOGRAPHIE.....	20
ANNEXES.....	23
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	25

Introduction

La mise en application en France des directives européennes 91/271/C.E.E. sur le traitement des eaux usées, 75/442/C.E.E. sur la mise en décharge des déchets ultimes et 86/278/C.E.E. sur les boues d'épuration devrait provoquer une augmentation de 30 à 50% du volume des boues résiduelles d'ici l'an 2002. L'utilisation agricole de ces dernières est sans doute un bon moyen de concilier une bonne gestion des ressources naturelles et un souci économique. En effet, le mode d'élimination par recyclage des boues via l'épandage agricole est intéressant en raison de leur valeur fertilisante (azote, phosphore, calcium) et du coût modeste de mise oeuvre. De telles pratiques demandent des règles strictes et définies afin de respecter chaque partie mise en jeu (agriculteurs, consommateurs, riverains, producteurs . .)

Les risques pour la santé publique associés à la réutilisation des boues en agriculture sont de deux natures

- ⊙ les risques chimiques : d'une part. les composés chimiques organiques (~~nitrates~~, pesticides, éthers, ..) et d'autre part les éléments traces métalliques (Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Zn, Mo, Co, **Cr**, . .)
- 3 les risques microbiologiques liés à la présence de microorganismes entériques pathogènes (virus, bactéries, parasites, champignons) et aux conditions de mise en oeuvre des opérations (respect des bonnes pratiques d'utilisation selon l'avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique Français)

En effet, il semble important de préciser que la maîtrise du risque sanitaire microbiologique des épandages de boues peut s'obtenir de deux façons :

soit en éradiquant le germe initialement présent c'est la logique des traitements dits « d'hygiénisation ». Il est alors évident que l'épandage de la boue ainsi traitée ne pose plus de problème sur ce point

- ⊙ soit en appliquant aux épandages des règles précises : délai après épandage sur prairie, jamais sur herbe haute, interdiction sur certaines cultures (légumes, . .), C'est ce qu'on appelle les « règles de bonne pratiques ».

Notre étude se focalise sur les problèmes parasitaires et en particulier sur le risque sanitaire potentiellement lié à la présence du protozoaire *Giardia* dans les boues urbaines car il fait partie des trois protozoaires à visée gastrointestinale, cosmopolite et à forte prévalence. a savoir *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum* et *Entamoeba histolytica* Ils sont responsables mondialement de plus de 1 milliard d'infections par an et contribuent à plus d'un million de décès annuellement, la plus grande part étant incombée à l'amibe (Warhurst R: Smith. 1992 cité par Girdwood, 1995) Le travail a porté essentiellement sur la logique des traitements d'hygiénisation, c'est à dire sur l'efficacité des traitements.

Les objectifs de l'étude sont :

- 0 l'élaboration de protocoles de purification-concentration des kystes de *Giardia* à partir de selles
- 0 l'adaptation de ces protocoles à des échantillons de boues résiduaires et la mise au point d'une technique d'évaluation de la viabilité des kystes de *Giardia*. Le protocole global retenu doit présenter un certain nombre de qualités
 - être polyvalent, c'est à dire s'appliquer à tous les types d'échantillons de boues et être représentatif dans la mesure où les échantillons de boues sont très hétérogènes même au sein d'un même type
 - ne pas affecter l'intégrité des kystes pour qu'une évaluation de la viabilité puisse être pratiquée
- 0 la détermination du niveau de la pollution en kystes de *Giardia* des boues résiduaires provenant de différentes filières afin
 - d'estimer le niveau moyen de contamination des différents types de boues et la viabilité des populations quantifiées
 - d'évaluer l'impact des divers traitements (stabilisation aérobie, digestion anaérobie, chaulage, séchage, compostage, stockage,) en terme d'abattement et d'inactivation
 - d'étudier les variations saisonnières

Les différentes informations retirées au niveau des diverses expérimentations permettront d'estimer la valeur du paramètre kyste de *Giardia* en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement

Conclusion

La valorisation agricole des boues résiduelles ne peut constituer un mode de réutilisation intéressant que dans la mesure où le risque sanitaire microbiologique est pris en compte et maîtrisé. L'évaluation de ce risque pour la santé publique passe par l'établissement de méthodes de détection et de quantification des kystes dans les boues mais aussi par l'estimation de leur viabilité, cionnée plus précise permettant une mesure plus exacte. Une autre manière d'évaluer le risque sanitaire est l'examen des voies d'exposition afin d'établir des règles pertinentes d'utilisation des boues (délai après épandage, nature des terrains, ...).

Notre travail s'est attaché à évaluer le risque sanitaire par l'étude de l'impact des traitements sur le parasite **Giardia**. Cette étude s'est déroulée en deux grandes parties.

La première partie du travail a permis de définir les protocoles de purification-concentration et d'évaluation de la viabilité des kystes de **Giardia** et s'est déroulée en trois temps :

↳ Dans un premier temps, il a été défini un protocole de purification-concentration des kystes de **Giardia** à partir de selles de malades permettant d'obtenir des suspensions stocks de kystes. Ce protocole a présenté l'avantage d'altérer le moins possible les kystes en évitant l'utilisation de réactifs chimiques. Une méthode associant des filtrations à une chromatographie gel filtration sur gel de sephadex G-50 medium a été mise au point et comparée à une technique de flottation au saccharose très employée dans la bibliographie. La chromatographie gel filtration a toujours assuré de meilleurs résultats que la flottation au saccharose et n'a pas eu l'impact négatif que présente le saccharose sur l'intégrité des kystes. Cette méthode est associée à une technique de détection par immunofluorescence directe qui facilite le repérage et donc la comptabilisation des kystes de **Giardia**.

↳ Dans un second temps, il a été développé un protocole de purification-concentration des kystes de **Giardia** à partir de boues résiduelles. Une étude préliminaire a comparé trois méthodes tirées de la bibliographie et a conclu que l'immunofluorescence directement appliquée aux boues semblait être la méthode de détection la plus performante. Mais, cette technique utilisée en l'état n'était pas applicable à tous les types d'échantillons et n'était ni représentative, ni répétitive.

Il a donc été ensuite envisagé une adaptation du protocole de purification-concentration par chromatographie gel filtration à partir de selles qui permettait une quantification correcte des kystes à partir de boues résiduelles. Le protocole arrêté présente un rendement moyen de 35.4%, de 30.6%, de 57.6% et de **36.4%** quand il est appliqué, respectivement à des selles de malades, des boues primaires, des boues digérées anaérobies et des boues déshydratées.

↳ Dans un troisième temps, une technique d'évaluation de la viabilité a été choisie et adaptée afin d'être greffée au protocole de purification-concentration précédemment défini. La méthode d'estimation de la viabilité sélectionnée était la technique de double coloration par le DAPI et le PI associée à une étude de la morphologie en microscopie DIC. Cette dernière a été comparée à deux techniques de coloration connues dans la littérature (exclusion à l'éosine, FDA/PI). Les résultats ont montré une bonne fiabilité de la méthode retenue, notamment grâce

aux différents critères nécessaires pour identifier un kyste viable. Pour envisager une détermination conjointe du nombre de kystes par immunofluorescence et de leur viabilité par coloration fluorochrome, il était ensuite nécessaire d'harmoniser les techniques de lecture. La technique conservée consistait en un dépôt d'un aliquot entre lame et lamelle, scellées entre elles par du vernis, et s'est montrée significativement plus performante que la technique habituellement employée en immunofluorescence directe.

La méthode complète de quantification et d'évaluation de la viabilité des kystes de *Giardia* dans les boues résiduaires, appelée méthode FCIS a été comparée avec une méthode directe de quantification des kystes dans les boues : la méthode SPDL. La comparaison effectuée sur des échantillons variés (boues primaires, boues digérées, boues séchées, boues compostées, ...) a montré que selon la nature de l'échantillon, l'une ou l'autre des méthodes était plus performante. En fait, les deux méthodes devaient être appréciées en terme de complémentarité. La méthode FCIS donnait des résultats plus faibles en raison des pertes occasionnées au cours des différentes étapes de purification-concentration alors que la méthode SPDL sous-estimait ou sur-estimait les concentrations en kystes du fait de l'importance du facteur masquage par les débris et des problèmes d'identification.

La deuxième partie du travail a consisté en une étude au niveau de différentes stations d'épuration, sur divers types de boues et divers types de traitements. Elle a permis, outre de valider la méthode FCIS, de retirer des informations à différents niveaux :

Les résultats quantitatifs obtenus avec la méthode FCIS et la méthode SPDL ont amené à conclure que les boues résiduaires étaient fortement contaminées par les kystes de *Giardia* car avec la méthode FCIS 67% des titres sont supérieurs à 10^4 kystes/g de MS dans les boues de niveau 1, 80% dans les boues de niveau 2 et 20% dans les boues de niveau 3 et avec la méthode SPDL respectivement 81%, 100% et 20%. Il a été ainsi démontré que le conditionnement physique des boues biologiques permettait une amélioration des performances des deux méthodes et que les traitements physico-chimiques entraînaient une diminution du nombre des kystes dans les boues.

En terme de viabilité, le pourcentage de kystes viables dans les boues est resté faible puisqu'il a atteint une moyenne :

- 0 de 4.2% dans les boues de niveau 1 avec aucun kyste viable dans les boues digérées anaérobies mésophiles, les boues digérées aérobies thermophiles et les boues en sortie de lagunage
- 0 de 1.3% dans les boues de niveau 2 ayant subi un traitement physique
- 0 de 0% dans les boues après traitement physico-chimique

Il est important de noter que ces faibles pourcentages correspondaient cependant à un maximum de 6111 kystes viables/g de MS dans les boues de niveau 1 et de 911 kystes viables/g de MS dans les boues de niveau 2, soit des valeurs très supérieures à la DMI du parasite *Giardia* de 10 à 100 kystes.

L'efficacité de divers traitements d'épuration a été déterminée par la mesure des abattements en kystes de *Giardia*. L'étude, uniquement basée sur le nombre de kystes a permis de conclure, en terme de quantification que la digestion anaérobie, les digestions aérobies thermophile et mésophile et le compostage étaient des traitements insuffisants, que le chaulage par chaux vive présentait des performances intermédiaires et que les traitements les plus

efficaces étaient le lagunage, le chaulage par chaux éteinte et surtout le séchage thermique qui était le seul traitement après lequel aucun kyste n'a pu être observé.

↳ Une étude sur le stockage des boues a montré que le traitement subi par les boues avant leur mise en stockage était un facteur important pour la réduction du nombre de kystes, la durée du stockage intervenant plus faiblement. En effet, sur une période de 21 jours, les boues primaires ont montré une stagnation des titres, les boues déshydratées indiquaient une augmentation progressive des titres et seulement dans les boues chaulées il était constaté une chute du nombre de kystes, surtout en début du stockage. En terme de viabilité, après un délai de 13 jours, la viabilité des kystes est à des valeurs inférieures à 1%.

↳ L'étude des propriétés kysticides d'un composé désinfectant (les ferrates) a révélé qu'au maximum l'abattement était de 1 log. Au niveau de la concentration en ferrates à employer, les résultats obtenus avec un apport de 18 g/L de ferrates ont toujours été supérieurs à ceux obtenus avec 12 g/L et l'apport fractionné de ferrates a entraîné des résultats supérieurs à l'addition en une seule fois. Néanmoins, il faut préciser que les diverses expérimentations ont été menées en quantification et en aucun cas en viabilité, l'étude devrait être complétée avec ce volet.

La détermination des pourcentages de kystes viables dans les échantillons de boues résiduaires a permis d'évaluer le risque sanitaire lié à une ingestion accidentelle de 1 g de boues ou de l'équivalent. Les résultats parfois élevés doivent être relativisés en raison des fortes teneurs en matières sèches de certains échantillons et des seuils de détection parfois importants qui servent à réaliser les calculs. Dans sept types de boues, le risque sanitaire calculé en fonction du nombre de kystes viables observés était égale à 0%, ce qui signifie que ces types de boues pourraient être épandus sans danger pour la santé publique en ce qui concerne *Giardia*. Il s'agit :

- des boues digérées anaérobies mésophiles
- des boues digérées aérobies thermophiles
- des boues en sortie de lagunage
- des boues chaulées (par chaux vive ou chaux éteinte)
- des boues séchées
- des boues compostées

Par ailleurs, la présence de *Giardia* dans les boues épandues ne se traduit pas pour autant par un risque pour la santé publique. Le respect des règles de bonnes pratiques rappelées par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique Française en 1997 peut également être une mesure efficace de maîtrise du risque. Ces règles n'ont cependant pas été testées vis à vis de *Giardia* dans le cadre de ce travail.

En fonction des informations obtenues, le kyste de *Giardia* pourrait être considéré comme un microorganisme indicateur intéressant, à la fois pour informer sur le niveau de contamination fécale des échantillons de boues résiduaires et pour étudier l'efficacité des différents traitements d'épuration. En effet, il est présent en grand nombre dans les boues biologiques et se maintient à des valeurs aisément détectables dans les boues conditionnées physiquement ou chimiquement et :

- o sa structure résistante et sa taille le rendent facilement détectable par immunofluorescence même dans des matrices chargées en sédiments

- 0 sa fragilité en terme de viabilité permet une gradation dans l'analyse de l'efficacité de traitement, d'une part par analyse de l'impact d'un traitement sur sa viabilité et d'autre part, par analyse de l'impact du traitement sur le nombre de kystes
- 0 deux méthodes simples ont été mises au point, l'une permettant uniquement une quantification des kystes et l'autre autorisant la quantification et l'évaluation de la viabilité des kystes conjointement. Ces deux méthodes complémentaires utilisées de façon associée permettent une analyse précise du degré de contamination des prélèvements environnementaux.

Au terme de ce travail, dans le cadre de l'épandage agricole des boues résiduelles, avec les outils mis à disposition, il pourrait être envisagé, dans une optique prospective, des études visant à comparer la présence de kystes de *Giardia* et celle des autres catégories de microorganismes présents dans ces prélèvements, notamment les autres germes témoins de l'efficacité des traitements (OTET) comme les salmonelles ou les helminthes