

## DESTRUCTION PAR LE XYLÈNE DE DIVERSES BACTÉRIES PATHOGÈNES DANS LE LISIER DE BOVINS (1)

Anne-Marie PLOMMET et M. PLOMMET

Station de Pathologie de la Reproduction,  
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,  
Nouzilly B. P. 1, 37380 Monnaie

---

### RÉSUMÉ

Il a été montré précédemment que l'on peut désinfecter (en moins d'un mois) le lisier de bovins à l'égard des *Brucella* par addition et mélange de 1 p. 1 000 de xylène au produit stocké en fosse.

On a étudié, *in vitro*, l'action du xylène sur les bactéries suivantes, mises en suspension dans une solution saline, dans du lisier stérilisé, et dans du lisier normal : *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium pyogenes* et *Brucella abortus*. A l'exception de *Str. faecalis*, on ne retrouve aucune de ces bactéries après 21 jours dans le lisier, pour un niveau de départ de  $10^6$ - $10^7$ /ml.

On en conclut que la méthode de désinfection du lisier en fosse est aussi efficace contre ces bactéries que contre *B. abortus*.

### INTRODUCTION

La durée de survie des *Brucella* dans le lisier de bovins atteints de Brucellose dépassant contre toute attente 8 mois, nous avons proposé la désinfection du lisier contaminé, avant son épandage, par le xylène (PLOMMET, 1972). Depuis les travaux précédents, nous avons poursuivi la surveillance des lisiers contaminés, produits dans nos installations, au cours de nos travaux sur la Brucellose, et confirmé ainsi sur un grand nombre d'épreuves l'efficacité du procédé (2). De plus, le xylène existe sous trois formes, ortho, méta et para ; les trois isomères sont commercialisés, mais à des prix assez différents selon les sources d'approvisionnement. Nous avons vérifié, dans un essai analogue à ceux décrits précédemment et ci-après, que les trois isomères ont une même efficacité sur *B. abortus*.

(1) Travail financé par la Société Dietevet.

(2) Le procédé de désinfection du lisier par le xylène a fait l'objet d'un brevet I. N. R. A.-A. N. V. A. R., n° 73.036.06, exploité par la Société Dietevet (Montfort-sur-Risle).

Cependant, si le lisier est un milieu très favorable à la survie des *Brucella*, et si son épandage constitue un mode privilégié de dispersion de l'infection, d'autres infections peuvent être transmises par cette voie : l'épandage contamine l'air (les gouttelettes d'aérosols peuvent porter à plusieurs kilomètres (ADAMS et SPENDLOVE, 1970), l'eau (de ruissellement, puis de rivière, RANKIN et TAYLOR, 1969) ou les végétaux et le sol. Les bacilles à Gram négatif, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, en particulier, suivent bien souvent un cycle de contagion comportant une phase de contamination par les lisiers et eaux d'égouts. La désinfection des lisiers par le xylène apporterait, si ce produit chimique était efficace, une solution simple et peu onéreuse pour interrompre le cycle de la contagion des infections correspondantes.

C'est pourquoi nous avons étudié, dans ce travail, l'efficacité *in vitro* du xylène à 1 p. 1 000 comme désinfectant du lisier de bovins. A cette dose et dans ce milieu, il s'est révélé actif sur les bactéries à Gram négatif en moins de 21 jours.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — Schéma des expériences

L'étude de l'efficacité d'un désinfectant *in vitro* doit être faite dans des conditions aussi proches que possible de celles où le produit sera utilisé dans la nature. Pour cela, il fallait travailler sur du lisier « naturel », simplement filtré sur gaze pour le débarrasser des plus grosses particules solides, placé en « anaérobiose », à 15°C. Nous avons opéré comme précédemment (PLOMMET, 1972).

Le lisier est réparti à raison de 100 ml dans des flacons de 125 ml à fermeture à vis, étanche, puis additionné de la culture bactérienne à éprouver, de manière à obtenir de 1. 10<sup>6</sup> à 1. 10<sup>7</sup> bactéries par ml. Le xylène est ajouté à raison de 0,1 ml dans les flacons traités ; les flacons « traités » et « témoins » sont bouchés, agités vigoureusement pendant environ 15 secondes, puis placés à l'étuve à + 15°C. Un « témoin » est utilisé immédiatement pour la numération au temps  $t = 0$ . Après des temps variables, on dénombre les bactéries survivantes ; chaque flacon n'est utilisé que pour un seul prélèvement, de manière à éviter l'interférence due à l'agitation sur la survie des bactéries.

Le dénombrement d'une bactérie donnée dans un milieu aussi pollué que le lisier pose des problèmes bactériologiques délicats.

Aussi avons-nous sérié les difficultés en commençant par étudier l'action du xylène sur les bactéries mises en suspension dans une solution saline tamponnée stérile (NaCl : 8,5 g ; PO<sub>4</sub>K<sub>2</sub>H : 2 g ; PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub> : 1 g ; eau q. s. 1 000 ml), car si le xylène n'était pas actif dans ces conditions, il ne pouvait pas l'être *a fortiori* dans le lisier. Puis nous avons étudié l'action du xylène dans du lisier stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 25 mn. Ces deux essais ont été faits en utilisant pour la numération un milieu non sélectif, la Gélose Trypticase Soja (TSA, B. D. Mérieux). Enfin, pour passer à l'étude en lisier non stérilisé, il convenait de rechercher des méthodes de dénombrement sélectif des bactéries étudiées aussi exactes que possible. Il convenait de s'assurer en particulier que le lisier n'apportait pas des bactéries similaires à celles que nous ajoutions et voulions dénombrer, et que la croissance éventuelle des bactéries du lisier sur le milieu sélectif ne réduisait pas notablement le nombre des colonies de la bactérie testée. Pour cela, nous avons comparé le nombre de bactéries retrouvées sur différents milieux sélectifs ensemencés à partir de suspensions bactériennes faites soit en solution stérile, soit dans du lisier normal. Le tableau 1 donne les résultats obtenus sur les milieux que nous avons en définitive retenus. On voit que le dénombrement n'est pas affecté par la présence des bactéries « normales » du lisier, à l'exception des staphylocoques sur milieu TGC. Les colonies de *Pseudomonas* sur milieu Red Bile Agar sont très petites mais dénombrables sans difficulté.

Nous pouvions donc, à l'aide de ces milieux, dénombrer les bactéries survivantes après les délais prévus.

Cependant, le lisier non stérile « témoin » peut, du fait des fermentations dont il est l'objet, ne pas être un milieu favorable à la survie de certaines bactéries pathogènes : nous avons donc opéré avec un double système de témoins : survie en solution tamponnée stérile, survie en lisier normal, survie en lisier traité (tabl. 4).

### 2. — Souches et suspensions bactériennes

Les souches suivantes ont été utilisées :

*Salmonella abortus ovis*, souche 15-5, du laboratoire ;  
*Salmonella typhimurium*, souche 18-a, du laboratoire ;  
*Escherichia coli*, souche 21-15, du laboratoire ;  
*Brucella abortus*, souche B 19, National Institute for Animal Diseases (AMES, U. S. A.) ;  
*Pseudomonas aeruginosa*, souche Institut Pasteur, Lille ;  
*Staphylococcus aureus*, souche 81-26, du laboratoire ;  
*Streptococcus faecalis*, souche 7-15, du laboratoire ;  
*Corynebacterium pyogenes*, souche J 9, du laboratoire.

Les 6 premières sont cultivées sur TSA en tube, pendant 24 h., puis récoltées en solution tamponnée, et diluées de sorte que 1 ml ajouté à 100 ml de lisier donne le titre de départ désiré ( $1 \cdot 10^6$  à  $1 \cdot 10^7$ /ml). *Str. faecalis* est cultivé en bouillon glucosé tamponné. *C. pyogenes* est cultivé en Brain Heart Infusion (BHI Difco) additionné de 5 p. 100 de sérum stérile de cheval, pendant 16 h. La culture de ces deux bactéries est diluée en solution tampon pour obtenir le titre désiré.

### 3. — Dénombrement des bactéries

La suspension, en solution tamponnée ou en lisier, est d'abord agitée, puis diluée en solution saline tamponnée. Chaque dilution est ensemencée sous le volume de 0,05 ml sur au moins 3 boîtes (1 pour quelques essais et 2 pour l'essai de traitement en solution saline), soit de milieu TSA (ou TSA additionné de 5 p. 100 de sérum pour *C. pyogenes*) pour les essais en milieu stérile, soit de milieu sélectif approprié.

Les colonies sont dénombrées après incubation convenable à 37°C. Sur milieux sélectifs, on compte les colonies ayant la morphologie propre à l'espèce étudiée, après vérification de leur identité.

Il est arrivé que des contaminations importantes rendent difficile le dénombrement de certaines bactéries (Ex. : Staphylocoques, Streptocoques) ; dans ce cas, on a repris la numération sur un autre échantillon. Le lisier est en effet un milieu peu homogène, ce qui peut conduire à quelques différences entre les facons d'un même lot. Tous les essais en lisier non stérilisé ont été faits en double ou triple avec des lisiers différents.

L'absence de la bactérie étudiée sur les boîtes est exprimée par 0 dans 0,1 ou 0,15 ml selon le volume total ensemencé.

## RÉSULTATS

### 1. — Action du xylène sur les bactéries en solution saline

Le tableau 2 montre que le xylène, ajouté à la dose de 1 p. 1 000 à une suspension de bactéries en solution saline, tue toutes les bactéries éprouvées en moins de 1 jour, à l'exception de *S. faecalis*. Rappelons que nos essais antérieurs avaient donné un résultat analogue avec *B. abortus* (moins de 2 jours).

### 2. — Action du xylène sur les bactéries dans du lisier stérilisé

Le tableau 3 montre que le xylène tue les bactéries en suspension dans du lisier stérilisé en moins de 4 jours, sauf *C. pyogenes* et *Str. faecalis*. On peut constater, par comparaison des tableaux 2 et 3, que la survie des bactéries est d'une manière générale moins longue dans le lisier qu'en solution saline, à l'exception à nouveau de *Str. faecalis*.

TABLEAU I

Comparaison du nombre de bactéries relevées sur milieux sélectifs ensemencés à partir de suspensions en solution saline tamponnée stérile ou en lisier de bovins non stérilisé.

Dilution à  $10^{-3}$ , ensemencement de 0,05 ml, moyenne de 3 à 5 boîtes.

Number of colony forming units on selective media plated with suspensions in sterile saline or liquid manure.

Dilutions of suspensions in buffer saline were at  $10^{-3}$ ; 0.05 ml per plate, average of 3-5 plates.

Bactéries (Bacteria)	Milieux (Medium)	Nombre de bactéries par ml (Number of bacteria per ml)	
		Solution saline (Saline)	Lisier (Liquid manure)
<i>Salmonella abortus ovis</i>	S. S. agar (Inst. Pasteur)	$3,1 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bismuth Sulfite agar (Oxoid)	$3,7 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^6$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Red bile agar (Difco)	$1,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	Red bile agar (Difco)	$1,0 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tellurite glycine agar (TGC) (SEVEL et PLOMMET, 1960)	$1,8 \cdot 10^6$	$7,3 \cdot 10^5$
<i>Streptococcus faecalis</i>	Milieu à l'acide nalidixique (Inst. Pasteur)	$4,4 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Milieu de Hoyle (Inst. Pasteur)	$7,9 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^5$

TABLEAU 2

*Action du xylène à 0,1 p. 100 sur la survie de différentes bactéries en solution saline tamponnée*  
(0 : moins de 1 bactérie dans 0,15 ml)

*Activity of xylene at 0.1 p. 100 on bacteria in buffer saline*  
(0 : less than one bacteria in 0.15 ml)

Bactéries (Bacteria)	Nombre de bactéries par ml (Number of bacteria per ml)				
	Témoin (Control)			Traité (Treated)	
	Jours (Days)			Jours (Days)	
	0	2	7	1	2
<i>S. abortus ovis</i> .....	3,4 · 10 <sup>6</sup>	2,9 · 10 <sup>6</sup>	8,8 · 10 <sup>5</sup>	0	0
<i>S. typhimurium</i> .....	4,6 · 10 <sup>6</sup>	3,7 · 10 <sup>6</sup>	1,4 · 10 <sup>6</sup>	0	0
<i>P. aeruginosa</i> .....	1,4 · 10 <sup>6</sup>	1,6 · 10 <sup>6</sup>	8,9 · 10 <sup>5</sup>	0	0
<i>E. coli</i> .....	4,7 · 10 <sup>6</sup>	4,2 · 10 <sup>6</sup>	1,5 · 10 <sup>6</sup>	0	0
<i>Str. faecalis</i> .....	1,8 · 10 <sup>6</sup>	1,7 · 10 <sup>6</sup>	2,4 · 10 <sup>5</sup>	2,4 · 10 <sup>5</sup>	1,7 · 10 <sup>3</sup>
<i>C. pyogenes</i> .....	1,0 · 10 <sup>6</sup>	1,2 · 10 <sup>6</sup>	1,0 · 10 <sup>5</sup>	0	0

TABLEAU 3

*Action du xylène à 0,1 p. 100 sur la survie de différentes bactéries mises en suspension dans du lisier stérilisé à l'autoclave*  
(0 : moins de 1 bactérie dans 0,1 ml)

*Activity of xylene at 0.1 p. 100 on bacteria in sterilized liquid manure*  
(0 : less than one bacteria in 0.1 ml)

Bactéries (Bacteria)	Nombre de bactéries par ml (Number of bacteria per ml)						
	Témoin (Control)				Traité (Treated)		
	Jours (Days)				Jours (Days)		
	0	4	7	14	4	7	14
<i>S. abortus ovis</i> ....	7,5 · 10 <sup>6</sup>	1,0 · 10 <sup>6</sup>	0		0		
<i>S. typhimurium</i> ...	2,2 · 10 <sup>7</sup>	3,9 · 10 <sup>6</sup>	2,8 · 10 <sup>4</sup>		0		
<i>P. aeruginosa</i> ....	1,9 · 10 <sup>7</sup>	3,3 · 10 <sup>6</sup>	0		0		
<i>E. coli</i> .....	2,1 · 10 <sup>7</sup>	3,5 · 10 <sup>6</sup>	1,6 · 10 <sup>4</sup>		0		
<i>Str. faecalis</i> .....	5,6 · 10 <sup>7</sup>	1,0 · 10 <sup>6</sup>	5,6 · 10 <sup>5</sup>	2,7 · 10 <sup>5</sup>	4,8 · 10 <sup>5</sup>	2,7 · 10 <sup>5</sup>	5,9 · 10 <sup>3</sup>
<i>C. pyogenes</i> .....	9,6 · 10 <sup>6</sup>	1,2 · 10 <sup>6</sup>	1,8 · 10 <sup>6</sup>	5,6 · 10 <sup>3</sup>	1,1 · 10 <sup>4</sup>	0	0



## 3. — Action du xylène sur les bactéries dans du lisier non stérilisé

Le tableau 4 montre :

1. que toutes les bactéries étudiées survivent généralement dans la solution saline tamponnée ;

2. que la durée de survie des bactéries dans le lisier normal, non stérilisé, est assez variable selon les bactéries et selon les essais ; on peut considérer trois groupes :

— bonne survie :  $10^5$  bactéries par ml au 21<sup>e</sup> jour : *Str. faecalis* et *B. abortus* ;

— survie moyenne :  $10^2$ - $10^3$  bactéries par ml à 21 jours : *Salmonella*, *Escherichia* et *Pseudomonas* ;

— survie faible : plus de bactéries à 21 jours : *Staphylococcus*, *Corynebacterium*.

3. que le xylène tue en moins de 21 jours toutes les bactéries éprouvées, à l'exception de *Str. faecalis*. On notera, par comparaison entre les lisiers témoins et les lisiers traités, que l'action du xylène se traduit par une diminution plus rapide du nombre de bactéries survivantes au cours des prélèvements successifs.

Ainsi, à 7 jours, l'écart est de l'ordre de 1 à 2 logarithmes pour *B. abortus*, *C. pyogenes* ; il est supérieur à cette valeur pour les autres bactéries. A 14 jours, l'écart est au moins égal à 2 logarithmes sauf pour *C. pyogenes*.

## DISCUSSION

Le xylène est parfois utilisé au laboratoire, comme d'ailleurs le chloroforme ou le toluène, pour tuer les bactéries d'une culture sans altérer les bactériophages. Quand ces bactéries sont suspendues dans une solution saline tamponnée, son action est très rapide sur la plupart des bactéries, à l'exception, parmi les espèces que nous avons testées, de *Str. faecalis*.

Dans un milieu très chargé en matières organiques comme le lisier stérilisé à l'autoclave, milieu par ailleurs moins favorable à la conservation des bactéries que la solution tamponnée, le xylène a encore une action très rapide, aboutissant dans nos essais à une stérilisation effective en 4 jours.

Dans le lisier normal, non stérilisé, milieu qui est, dans les conditions naturelles de stockage et dans nos modalités expérimentales *in vitro*, l'objet de fermentations anaérobies actives, la plupart des bactéries éprouvées survivent assez bien : en partant d'un niveau de l'ordre de  $10^6$  par ml, on en retrouve toujours après 15 jours, et encore très souvent après 21 jours. Dans ces conditions, le xylène accélère la vitesse de « disparition » naturelle des bactéries. Cela peut s'exprimer par une différence dans le nombre de bactéries survivantes, revivifiables, de l'ordre de 2 logarithmes au moins entre « témoin » et « traité » après 8 et 15 jours. Après 21 jours, en partant toujours d'un niveau de  $10^6$  par ml, on ne retrouve pas les bactéries ajoutées, à l'exception de *Str. faecalis*. Le cas le plus typique est celui de *B. abortus*, bactérie capable de survivre dans le lisier sans modification notable pendant 8 mois. Rappelons que le chloroforme et le toluène se sont révélés peu ou pas actifs dans ces conditions (PLOMMET, 1972).

Si on admet que le niveau de contamination du lisier par les bactéries pathogènes ne doit pas, dans les conditions naturelles, dépasser  $10^4$  par ml, la décontamination totale par le xylène, ajouté à la dose de 1 p. 1 000, ne doit pas excéder 15 jours. Une marge d'une semaine, soit 21 jours, doit assurer dans tous les cas une sécurité suffisante.

Le mode d'action du xylène sur les bactéries n'est pas bien connu ; il provoque une destruction des structures membranaires (DUBRAY, communication personnelle). Comme cet hydrocarbure n'est pas soluble dans l'eau et qu'il est volatil, on peut se demander par quel mécanisme il entre en contact avec la bactérie, alors que l'agitation, qui a pour but de le mettre en suspension, est de très courte durée, et que son activité se manifeste, dans le lisier, sur une longue période. Il est possible qu'une meilleure connaissance de ce mécanisme conduise à proposer, dans la pratique, un mode d'emploi plus efficace.

Si en effet, dans la pratique, la désinfection du lisier par le xylène ne soulève pas de difficultés majeures quand les installations disposent de fosses de stockage de capacité suffisante, on peut se demander comment il conviendrait d'opérer avec des installations de faible capacité et à remplissage continu. Il est probable qu'en rechargeant périodiquement la fosse avec du xylène et en brassant le mélange vigoureusement, par exemple chaque semaine, on accélère le processus de désinfection, et que l'on peut obtenir rapidement un lisier à peu près totalement décontaminé. Cette hypothèse mériterait d'être vérifiée.

La dissémination dans la nature des germes pathogènes du lisier, en particulier par l'épandage sous pression, qui crée des aérosols portant à longue distance sous le vent, présente des risques non négligeables pour les populations humaines et animales du voisinage. A défaut de solution plus satisfaisante — susceptible en particulier de supprimer les odeurs nauséabondes du lisier, ce que le xylène ne fait pas — la désinfection des lisiers par le xylène devrait être généralisée et rendue obligatoire en cas d'épizootie grave dans les troupeaux.

*Reçu pour publication en mars 1974.*

## SUMMARY

### KILLING OF DIVERSE PATHOGENIC BACTERIA IN BOVINE LIQUID MANURE BY XYLENE

It has been previously shown that xylene added (1,000 p.p.m.) to *Brucella abortus* contaminated bovine liquid manure stored in tanks kills the bacteria in less than one month.

Activity of xylene (1,000 p.p.m.) on others bacteria suspended in either sterile saline, sterilized liquid manure or normal liquid manure was studied *in vitro*.  $10^6$ - $10^7$  bacteria per ml of the strains : *Salmonella abortus ovis*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pyogenes* and *B. abortus* in normal manure were killed in less than 21 days. *Str. faecalis* was not affected.

Efficiency of xylene as desinfectant of liquid manure stored in tanks should be as good against these bacteria as against *Brucella*.

## РЕЗЮМЕ

Уничтожение разных патогенных бактерий в навозной жиже крупного рогатого скота при помощи диметилбензина.

Нами было показано, что дезинфекцию навозной жижи, по сколько она касается *Brucella*, можно произвести — за несколько недель — прибавлением 1 на 1 000 диметилбензина, прибавляя его и смешивая прямо в яме стока продукта.

Нами изучалось, *in vitro*, действие диметилбензина на следующие бактерии, содержащиеся в суспензии в сольном растворе, сначала в стерилизованной навозной жиже, потом в нормальной навозной жижи: *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas Staphylococcus*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium pyogenes* и *Brucella abortus*. После 21ого дня, за исключением *Streptococcus faecalis* больше нет ни одной из этих бактерий в навозной жиже, когда в начале опыта их было  $10^6$ - $10^7$ /мл.

В заключение можно сказать, что методики дезинфекции навозной жижи в яме дает удовлетворительные результаты в борьбе против этих бактерий, как и против *B. abortus*.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS A. P., SPENDLOVE J. C., 1970. Coliform aerosols emitted by sewage treatment plants. *Science*, **169**, 1218-1220.
- PLOMMET M., 1972. Survie de *Brucella abortus* dans le lisier de bovins. Désinfection par le xylène. *Ann. Rech. vétér.*, **3**, 621-632.
- RANKIN J., TAYLOR R., 1969. A study of some disease hazards which could be associated with the system of applying cattle slurry to pasture. *Veter. Rec.*, **85**, 578-581.
- SEVEL B., PLOMMET M., 1960. Adaptation d'un milieu sélectif à l'isolement des staphylocoques de Mammite. Application au diagnostic d'étable. *Le Lait*, **40**, 2-8.
-