



➤ Procédés de biotechnologies environnementales et coronavirus

Ariane Bize

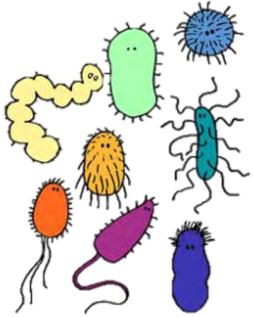
Unité PROSE (Procédés biotechnologiques au service de
l'environnement)

Antony, 92

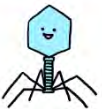
ariane.bize@inrae.fr

➤ Procédés de biotechnologies environnementales et virus

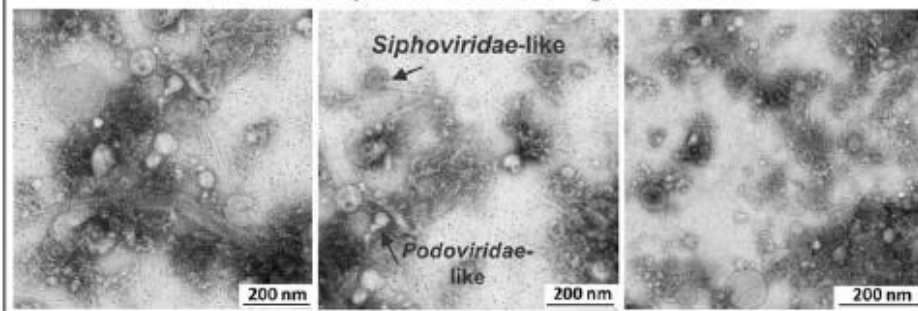
Exemple de la méthanisation



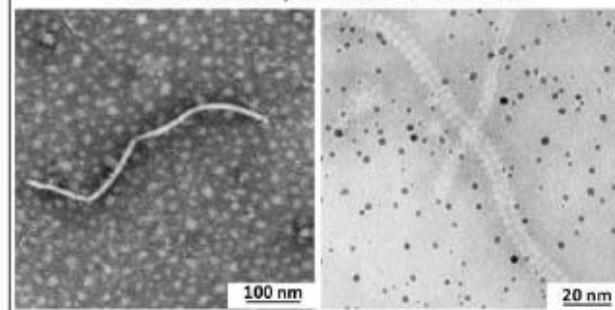
- La méthanisation repose sur l'activité catalytique de communautés microbiennes complexes
 - Ex, de l'ordre de 600 à 1000 espèces microbiennes, de distribution non-uniforme : seules quelques-unes sont dominantes ; redondance fonctionnelle
- Des virus de ces microorganismes (archées, bactéries) sont naturellement présents et abondants et peuvent se reproduire au sein de cet écosystème
 - participent certainement à la structuration et à la dynamique des communautés microbiennes
 - non-pathogènes pour l'homme
 - mais encore très peu étudiés
- Possible présence de virus pathogènes « importés » (de plante, animal, homme)
 - *a priori* minoritaires et ne se reproduisant pas au sein du procédé
 - **Question du maintien du caractère infectieux en sortie de procédé**



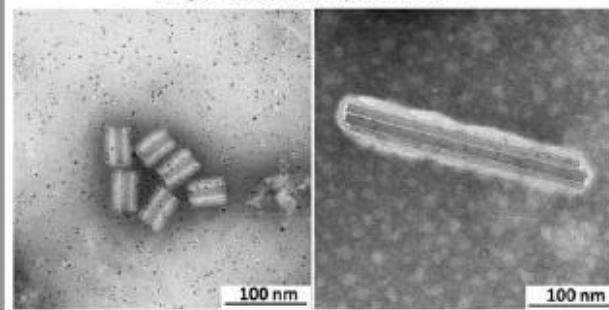
VLPs diversity in AD reactors – general view



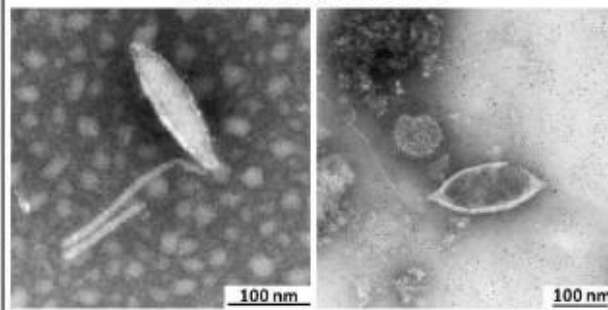
Flexuous-shaped filaments VLPs



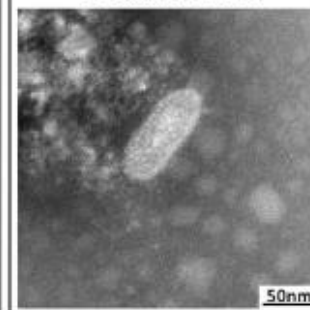
Rigid rods-shaped VLPs



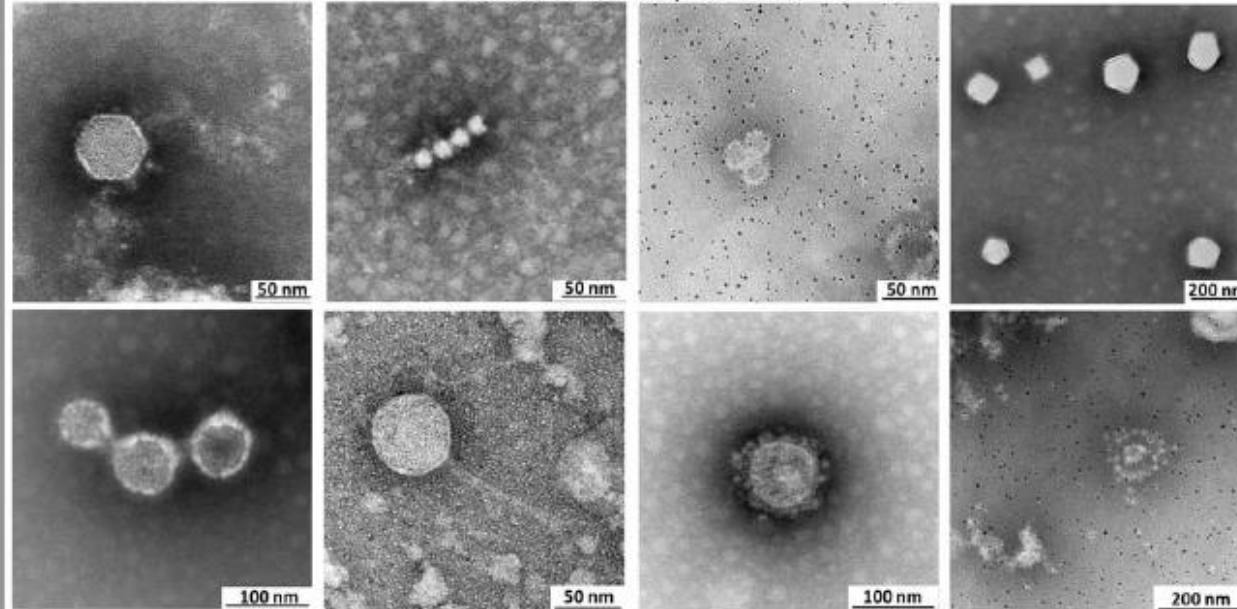
Lemon-shaped VLPs



Bacilliform VLP



Icosahedral-shaped VLPs



Calusinska, Magdalena, *et al.*
 "Analysis of ds DNA and RNA
 viromes in methanogenic
 digesters reveals novel viral
 genetic diversity."
Environmental microbiology
 18.4 (2016): 1162-1175.

➤ Influence de multiples facteurs sur la stabilité des particules virales

On peut donc imaginer des effets différents sur les particules virales, selon les procédés

Procédé	Présence d'oxygène	Température
Boues activées	aérobie	T ambiante, extérieur (5°C-25°C)
Compostage	aérobie	Jusqu'à 50°C-60°C, voire 70°C
Méthanisation	anaérobie	Mésophile (35°C) Thermophile (55°C) Psychrophile (T ambiante, extérieur , 5-25°C)

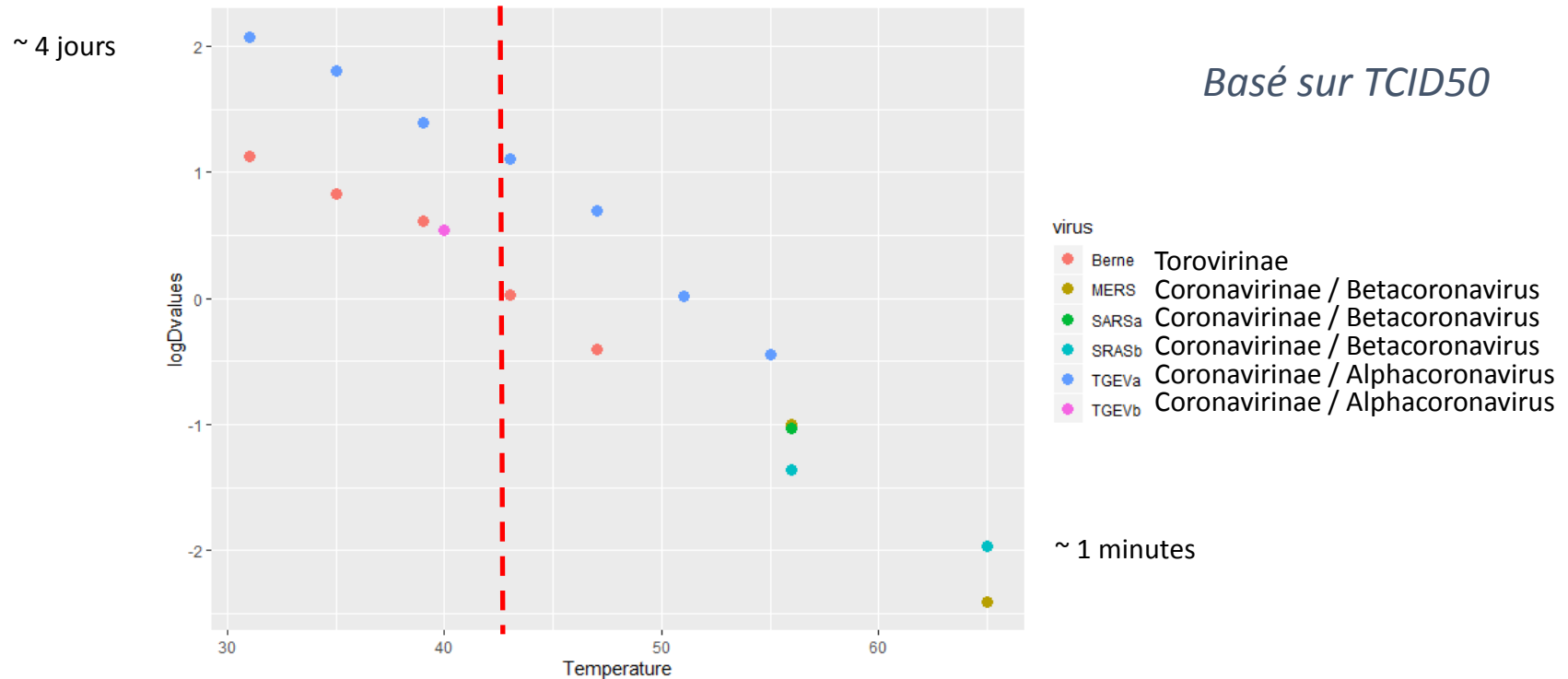
Autres paramètres potentiellement importants : pH, temps de séjour, interactions chimiques, taux d'humidité, activité microbienne, ...

➤ Influence de multiples facteurs sur la stabilité des particules virales

Les coronavirus sont sensibles à la température

**Log (durée de réduction décimale D) observée à différentes températures (°C)
pour des virus de la famille Coronaviridae**

D est la durée requise pour diviser par 10 la population initiale de virus (en heures)



➤ Influence de multiples facteurs sur la stabilité des particules virales

SARS-CoV2 sensible à la température en particulier

Time	Virus titre (Log TCID ₅₀ /mL)									
	4°C		22°C		37°C		56°C		70°C	
	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD
1 min	N.D.	N.D.	6.51	0.27	N.D.	N.D.	6.65	0.1	5.34	0.17
5 mins	N.D.	N.D.	6.7	0.15	N.D.	N.D.	4.62	0.44	U	-
10 mins	N.D.	N.D.	6.63	0.07	N.D.	N.D.	3.84	0.32	U	-
30 mins	6.51	0.27	6.52	0.28	6.57	0.17	U	-	U	-
1 hr	6.57	0.32	6.33	0.21	6.76	0.05	U	-	U	-
3 hrs	6.66	0.16	6.68	0.46	6.36	0.19	U	-	U	-
6 hrs	6.67	0.04	6.54	0.32	5.99	0.26	U	-	U	-
12 hrs	6.58	0.21	6.23	0.05	5.28	0.23	U	-	U	-
1 day	6.72	0.13	6.26	0.05	3.23	0.05	U	-	U	-
2 days	6.42	0.37	5.83	0.28	U	-	U	-	U	-
4 days	6.32	0.27	4.99	0.18	U	-	U	-	U	-
7 days	6.65	0.05	3.48	0.24	U	-	U	-	U	-
14 days	6.04	0.18	U	-	U	-	U	-	U	-

Chin et al, **2020** Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions.
The Lancet Microbe. 10.1016/S2666-5247(20)30003-3



INRAE

Biotechnologies environnementales et SARS-CoV2

07/05/2020 / conférence RISPO / A. Bize

➤ Influence de multiples facteurs sur la stabilité des particules virales

SARS-CoV2 semble peu sensible au pH dans une gamme assez large (pH 3-10)

pH (60 mins)	Virus titre (Log TCID ₅₀ /mL)	
	Mean	±SD
3	5.55	0.25
4	5.67	0.36
5	5.73	0.04
6	5.75	0.08
7	5.58	0.22
8	5.70	0.14
9	5.54	0.44
10	5.51	0.11

Chin et al, **2020** Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions.
The Lancet Microbe. 10.1016/S2666-5247(20)30003-3

➤ Attention à ne pas directement transposer...

...les résultats obtenus en laboratoire, concernant des facteurs isolés, au cas des procédés de biotechnologies environnementales

- Matrices hétérogènes et complexes, parfois variables dans le temps → possibilités d'interactions stabilisantes entre particules virales et matrice
 - Ex des interactions entre microbiote et virus entériques : stabilisation par les interactions avec des lipopolysaccharides ou des peptidoglycanes

Karst, *Nature Reviews Microbiology*. **2016** Apr;14(4):197.

Waldman et al, *Environmental science & technology*. **2017** Dec 5;51(23):13633-40.

➤ Attention à ne pas directement transposer...

...les résultats obtenus en laboratoire, concernant des facteurs isolés, au cas des procédés de biotechnologies environnementales

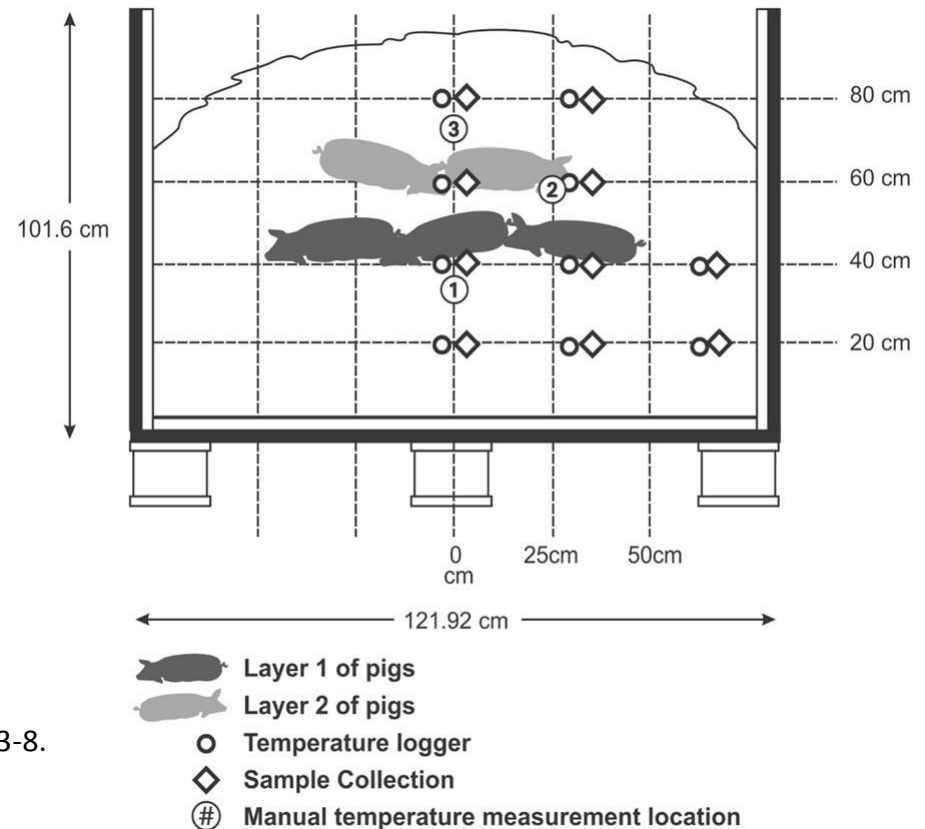
- Possibilité d'une dégradation biologique des particules virales ? Par des enzymes (lipases, protéases) secrétées en lien avec l'activité microbienne
- Pour un même type de procédé, il peut parfois y avoir une variété de technologies et de configurations



➤ Compostage

Etude sur l'efficacité du compostage pour le traitement de carcasses de porc infectées avec le PEVD (porcine epidemic diarrhea virus, Alphacoronavirus)

- En laboratoire (conditions contrôlées)
- Andain contenant carcasses de porcelets, et des copeaux de bois
- Des capteurs de températures à plusieurs niveaux dans l'andain
- 2 cycles de compostage de 36 et 37 jours
- Quantification du génome viral par qRT-PCR à la fin de chaque cycle

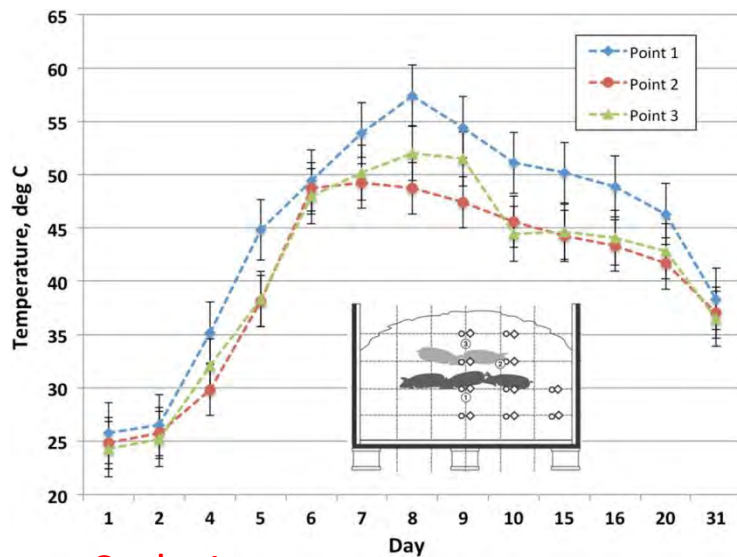


Quist-Rybachuk *et al*, *Veterinary microbiology*. **2015** 181(3-4):283-8.

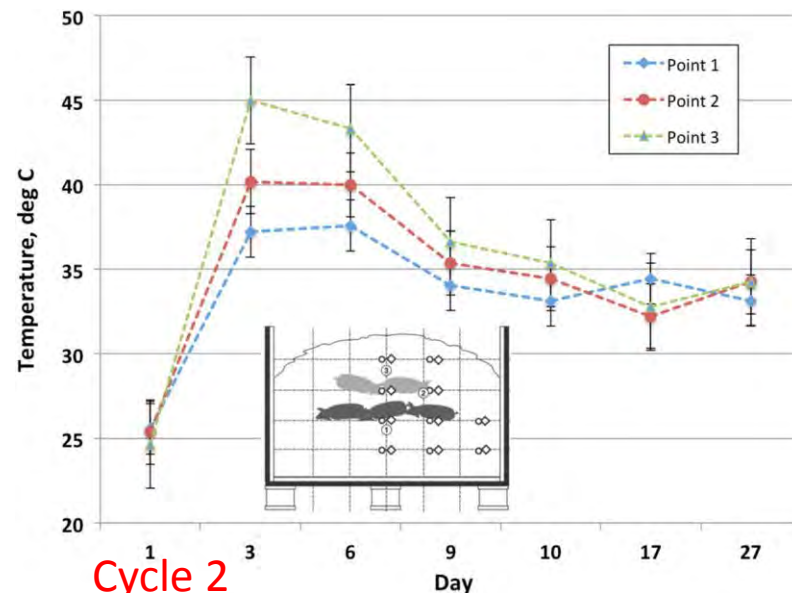
➤ Compostage

Pas de génome viral détecté en fin de 1^{er} cycle (36 jours)

- malgré une dégradation incomplète des carcasses
- malgré une montée en température relativement limitée



Cycle 1



Cycle 2

Résultats cohérents avec des études antérieures réalisées sur d'autres familles de virus. La température est un facteur important mais ne semble pas être le seul impliqué.

➤ Méthanisation

Devenir de pathogènes présents dans le fumier durant la méthanisation

7 installations de méthanisation localisées aux Etats-Unis : à la ferme (5), territoriale (1), en abattoir (1)

Prélèvements ~ bihebdomadaires de décembre 2011 à août 2012 (~17 prélèvements par installation)

Détection par qPCR ou RT-qPCR selon la nature du génome

Microbe†	Detection frequency (n)		Concentration	
	Influent	Effluent	Influent	Effluent
	— % (no.) —		— copies wet g ⁻¹ —	
<i>Bacteroidales</i> -like CowM3	100 (118)	95 (119)	3.1×10^4 – 1.4×10^9 , 6.5×10^6	1.9×10^4 – 2.8×10^7 , 1.3×10^6
Bovine <i>Bacteroides</i>	99 (118)	97 (119)	2.4×10^3 – 1.5×10^8 , 3.0×10^6	2.6×10^3 – 7.0×10^6 , 5.0×10^5
Bovine polyomavirus	99 (118)	100 (119)	7.3×10^3 – 3.0×10^8 , 9.2×10^5	6.4×10^3 – 7.1×10^7 , 2.8×10^5
Bovine enterovirus	92 (118)	14 (118)	1.1×10^4 – 1.0×10^7 , 2.6×10^5	1.4×10^4 – 1.6×10^5 , 4.4×10^4
<i>Clostridium perfringens</i>	69 (118)	19 (119)	6.0×10^2 – 2.4×10^6 , 2.2×10^4	2.4×10^3 – 3.8×10^5 , 2.9×10^4
<i>Campylobacter jejuni</i>	65 (118)	19 (118)	8.8×10^2 – 2.4×10^5 , 1.0×10^4	9.1×10^2 – 2.7×10^4 , 3.6×10^3
Bovine coronavirus (Betacoronavirus)	59 (118)	0 (116)	9.1×10^3 – 5.6×10^9 , 3.8×10^5	Not detected
Group A rotavirus	50 (118)	17 (119)	2.8×10^3 – 8.1×10^7 , 1.1×10^5	8.7×10^3 – 7.2×10^6 , 1.0×10^5
<i>Salmonella</i> spp.	29 (118)	3 (77)‡	3.7×10^2 – 1.9×10^5 , 6.3×10^3	3.1×10^3 – 1.8×10^4 , 7.6×10^3
Bovine adenovirus	8 (118)	1 (77)‡	2.9×10^3 – 2.6×10^4 , 5.0×10^3	3.2×10^3 (n = 1)
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	4 (118)	0 (56)‡	1.4×10^3 – 8.5×10^4 , 8.2×10^3	Not detected
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0.8 (118)	0 (35)‡	4.4×10^3 (n = 1)	Not detected
<i>Giardia lamblia</i>	0.8 (118)	0 (35)‡	1.3×10^4 (n = 1)	Not detected

➤ Projet collaboratif en cours

Projet OBEPINE OBservatoire EPIdémiologique daNs les Eaux usées

Quantification par RT-qPCR

Incluant entre autres : eaux usées, boues de STEP, boues de STEP digérées par voie mésophile ou thermophile (expériences en pilotes)

INRAE

Biotechnologies environnementales et SARS-CoV2

07/05/2020 / conférence RISPO / A. Bize



➤ Pour d'éventuelles questions: boues activées

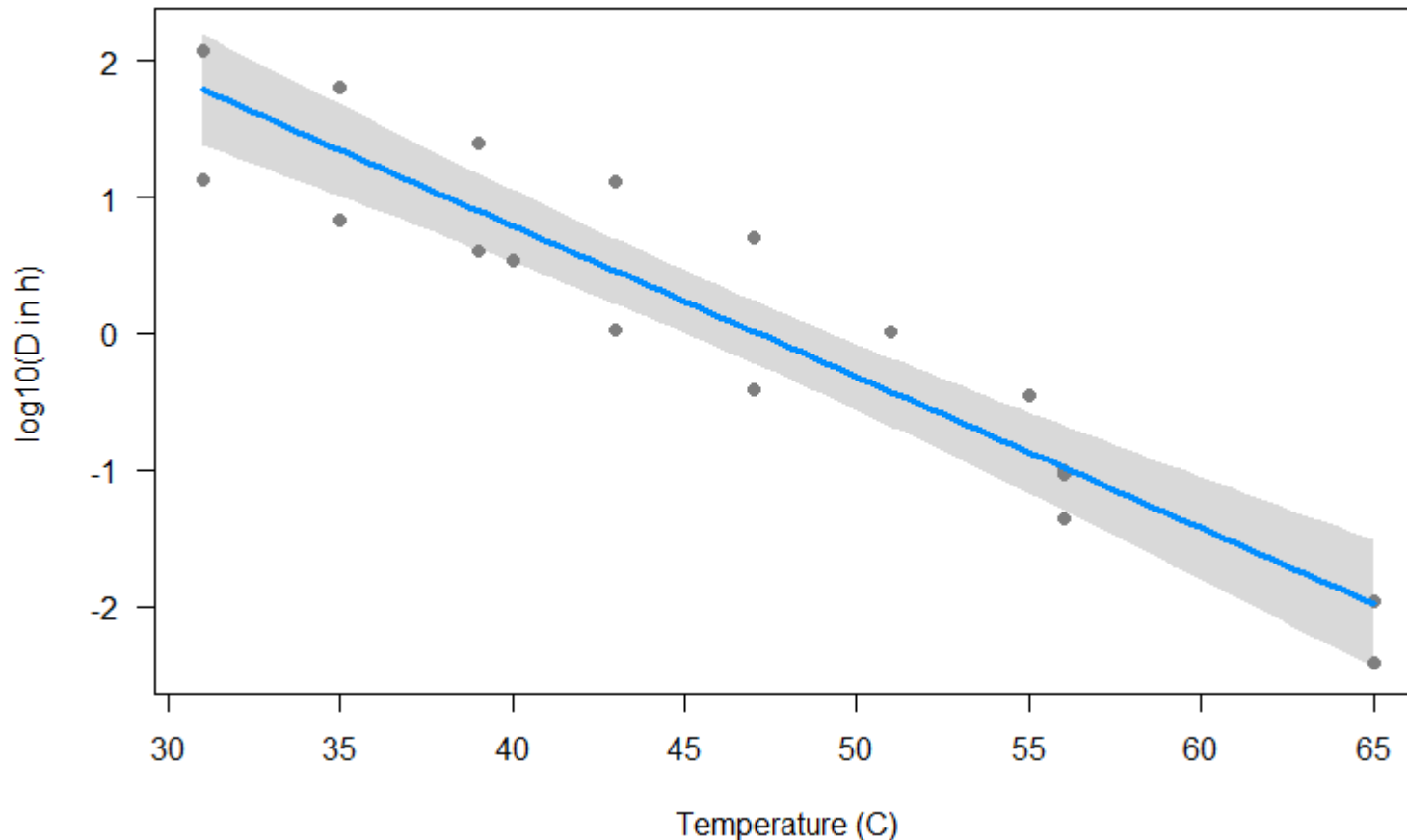
Both human coronavirus (HCoV-229E) and feline coronavirus [(F-CoV or feline infectious peritonitis virus (FIPV))] survived for 2 days and decayed after 3 days in primary and secondary effluents (activated sludge) at 23°C (Gundy et al., 2009).

The TGEV and the MCoV (MHV) survived for longer periods (21 days for both) in pasteurized settled sewage at room temperature. The TGEV decayed after 35 days while M-CoV was inactivated within 28 days under the same conditions (Casanova et al. (2009).

Table 3: Persistence of coronaviruses in human excrements

Excrement type	Virus	Temp (°C)	Persistence	Time of complete decay	# of log reduction	Reference
Primary effluent	HCoV-229E	23	2d	3d	>2	Gundy et al. (2009)
Primary effluent	FCoV (FIPV)	23	2d	3d	>3.1	Gundy et al. (2009)
Secondary effluent	HCoV-229E	23	2d	3d	>2.9	Gundy et al. (2009)
Secondary effluent	FCoV (FIPV)	23	2d	3d	>3.7	Gundy et al. (2009)

➤ Pour d'éventuelles questions : température



Linear model fit to log₁₀ (D) according to temperature

➤ Pour d'éventuelles questions : aérosols

The detection of RNA of an animal CoV (such as PEDV) in air at 16.1 Km distance from an infected farm in the US indicates possible airborne transmission (Alonso et al., 2014). Yet, the detection of SARS-129 CoV2 or its RNA in aerosols has not been reported. However, confirmed aerosol transmission of 130 other coronaviruses suggests possible aerosol transmission of SARS-CoV2 (Ge et al., 2020).

3h aerosolization time at room temperature (21-23°C) and fixed relative humidity (RH) of 65%. The results showed that both viruses were detectable at the end of the 3 h aerosolization. The median half-lives were 1.09 and 1.18 h for SARS-CoV2 and SARS-CoV1, respectively (van Doremalen et al., 2020).

In another study, aerosolized SARS-CoV2 retained its infectivity constant for a period of 16h at room temperature and the study concluded that the virus can be considered as an airborne pathogen (Fears et al., 2020).

humidity can play a role in virus persistence in environment, particularly in aerosols.

➤ Pour d'éventuelles questions : eaux usées

The SARS-CoV1 stayed detectable for 14 days in domestic sewage when it was stored at 4°C but for 2 days only at 20°C (Wang et al., 2005). In pasteurized settled sewage, both porcine coronavirus (TGEV) and the mouse coronavirus (M-CoV or MHV) stayed detectable up to 35 days at 4°C while at 25°C they were detectable for 21 days only (Casanova et al. (2009).

➤ Pour d'éventuelles questions : eaux usées

Table 3: Persistence of coronaviruses in human excrements

Excrement type	Virus	Temp (°C)	Persistence	Time of complete decay	# of log reduction	Reference
Stool (pH 6-7) from baby	SARS-CoV 1	20	1h	3 h	4.75	Lai et al. (2005)
Stool (pH 7-8) from normal adult	SARS-CoV 1	20	3h	6 h	4.75	Lai et al. (2005)
Stool (pH 8) from normal adult	SARS-CoV 1	20	6h	1 d	4.75	Lai et al. (2005)
Stool (pH 9) from adult with diarrhea	SARS-CoV 1	20	4d	5 d	4.75	Lai et al. (2005)
Stool	SARS-CoV 1	20	3d	4 d	5	Wang et al. (2005)
Domestic sewage	SARS-CoV 1	20	2d	3 d	5	Wang et al. (2005)
Domestic sewage	SARS-CoV 1	4	14d	NR	NR	Wang et al. (2005)
Pasteurized settled sewage	TGEV	25	21d	35	6.25	Casanova et al. (2009)
Pasteurized settled sewage	TGEV	4	35d	NR	1.5	Casanova et al. (2009)
Pasteurized settled sewage	MCoV (MHV)	25	21d	28d	>6.5	Casanova et al. (2009)
Pasteurized settled sewage	MCoV (MHV)	4	35d	NA	1	Casanova et al. (2009)
Primary effluent	HCoV-229E	23	2d	3d	>2	Gundy et al. (2009)
Primary effluent	FCoV (FIPV)	23	2d	3d	>3.1	Gundy et al. (2009)
Secondary effluent	HCoV-229E	23	2d	3d	>2.9	Gundy et al. (2009)
Secondary effluent	FCoV (FIPV)	23	2d	3d	>3.7	Gundy et al. (2009)
Urine	SARS-CoV 1	20	17d	NR	NR	Wang et al. (2005)
Urine	SARS-CoV 1	21-25	5d	NR	NR	Duan et al. (2003)
Sputum	SARS-CoV 1	21-25	5d	NR	NR	Duan et al. (2003)
Serum	SARS-CoV 1	21-25	4d	5d	6	Duan et al. (2003)

NR: Not reported

TGEV: Transmissible gastroenteritis virus (porcine virus)

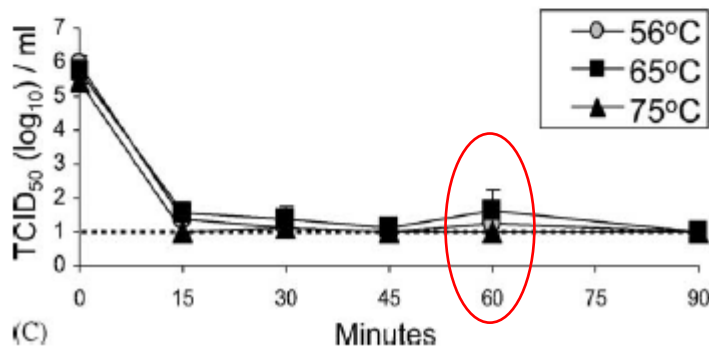
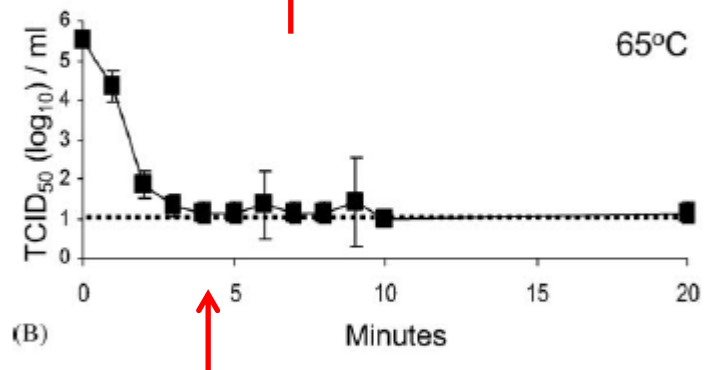
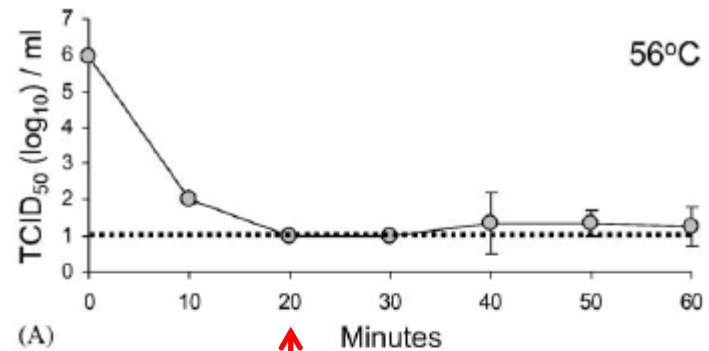
M-CoV (MHV): Murine coronavirus (Mouse hepatitis virus)

F-CoV: Feline coronavirus

FIPV: feline infectious peritonitis virus

➤ Pour d'éventuelles questions : température

Exemple de SARS-Cov1,
Betacoronavirus
(2003)



➤ Pour d'éventuelles questions : méthanisation

Smith SR, Lang NL, Cheung KH, Spanoudaki K. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Management*. **2005** 25(4):417-25.

Existence de modèles prédictifs

- Thermal inactivation kinetics of enteric bacteria at high temperatures ($>55^{\circ}\text{C}$) are controlled by the intrinsic heat resistance of microbial isolates, stress induced by the matrix environment (e.g., electrolyte content, pH value) and retention time.
- Temperature is not directly responsible for pathogen inactivation under mesophilic conditions and the heat resistance characteristics of microbial isolates or matrix properties are also unimportant.
- Microbial competition and substrate limitation, linked to the efficient stabilisation of biowaste, are likely to be the primary factors responsible for reducing the viability of enteric bacteria during mesophilic digestion.

➤ Pour d'éventuelles questions : classification

- ICTV
- ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/294>)
 - ssRNA+, Nodovirales order, Coronaviridae family, Coronavirinae sub-family, Betacoronavirus genus

