

SYNTHESE / EXTENDED ABSTRACT
FRANÇAIS / ENGLISH

**MICROBIOLOGIE ET DECHETS :
EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES**

**MICROBIOLOGY AND WASTES:
HEALTH RISK ASSESSMENT**

juin 2011

P. DE GIUDICI, M.-T. GUILLAM, C. SEGALA
- SEPIA-Santé



Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles. Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégalement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

- ✓ En Bibliographie, le document dont est issue cette synthèse sera cité sous la référence :
RECORD, Microbiologie et déchets : évaluation des risques sanitaires, 2011, 100 p, n°09-0669/1A

- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)
www.ademe.fr

RESUME

Dans le cadre des approches d'Évaluations des Risques Sanitaires, les Évaluations des Risques Microbiologiques (ERM) sont les plus difficiles à réaliser. Un travail de recherches et d'analyses bibliographiques a été mené afin d'actualiser les connaissances sur ce thème.

Les méthodes d'ERM ont été calquées sur le modèle de l'évaluation du risque chimique (succession des 4 étapes). Selon les connaissances disponibles, l'objectif et le mode d'expression des résultats recherchés, trois types d'ERM peuvent être mis en œuvre : qualitative (la plus fréquente), semi-quantitative et quantitative (EQRM). Cette dernière est fortement basée sur l'approche menée en risque chimique. Cependant, l'ERM présente des spécificités liées aux pathogènes infectieux (bactéries, virus, protozoaires, champignons, helminthes et prions) qui rendent difficile l'application de la démarche chimique.

Les méthodes d'identification et de quantification des germes ont connu des avancées significatives ces dernières années avec notamment le développement des techniques d'amplifications géniques.

Concernant les transferts et la survie des germes dans les différents milieux, les transferts aériens ont été relativement bien étudiés et ont fait l'objet de modélisations. Les transferts au sein du sol, dans la zone non saturée semblent limités aux organismes de taille réduite (virus). Des données existent sur les transferts de germes vers les végétaux, mais les connaissances sont encore insuffisantes pour les estimer quantitativement.

Si les exemples d'EQRM sont relativement nombreux dans le domaine de la sécurité alimentaire, les EQRM appliqués à la filière déchets concernent essentiellement l'épandage de boues d'épuration et les plateformes de compostage des déchets, principales sources d'exposition des populations générales. Mais lorsque qu'une exposition multimédia est étudiée, par exemple dans le cas d'épandage, les incertitudes apparaissent notamment au niveau des coefficients de transfert entre milieux et de survie dans les différents milieux, fragilisant les résultats quantitatifs obtenus. Les besoins en matière de recherche vis-à-vis de la filière déchets concernent donc, d'une part le renforcement des connaissances permettant de réduire les incertitudes afférentes aux différentes étapes de l'EQRM et d'autre part l'applicabilité au domaine microbiologique des connaissances sur les transferts de milieu et leurs modélisations. Des études épidémiologiques pourraient également s'avérer profitables à proximité des zones d'épandage et des grandes plateformes de compostage ou de stockage des déchets.

MOTS CLES

Risques microbiologiques, évaluation des risques, EQRM, déchets, boues.

SUMMARY

In the field of health risk assessment, Quantitative Microbiological Risks Assessments (QMRA) are the most difficult to carry out. A bibliographic work was made in order to update existing knowledge on this topic.

The methods of Microbiological Risks Assessments (MRA) were copied on the model of the chemical risk assessment (succession of the 4 stages). According to the available knowledge, the objective and the mode of expression of expected results, three types of MRA can be implemented: qualitative (most frequent), semi-quantitative and quantitative. The latter is strongly based on the approach carried out in chemical risk.

However, the MRA has some specificities related to pathogenic agents (bacteria, viruses, protozoa, fungi, helminths and prions), that make difficult the use of the chemical approach.

The methods of identification and quantification of the germs knew significant improvements these last years in particular with the development of genic amplifications techniques.

Concerning the transfers and the survival of the germs in the various media, the air transfers were relatively well studied and models were established. The soil transfers, in the unsaturated zone seem limited to the germs of reduced size (virus). Data exist on the transfers of germs towards the plants, but knowledge is still insufficient to estimate them quantitatively.

If the examples of QMRA are comparatively numerous in the field of food safety, the QMRA applied to the waste relates primarily to the spreading of sewage sludge and the installations of waste composting, principal sources of the general populations' exposure. But if a multi-media exposure is considered, for examples in the case of spreading, uncertainties appear in particular for the transfer coefficients between media and survival coefficients in the various media, weakening the quantitative results obtained. The research needs in waste treatment relate on one hand to the reinforcement of knowledge to reduce uncertainties related at the various stages of the QMRA and on the other hand, to the adaptation of knowledge on transfers and their modelling. Epidemiologic studies should be carried out near the zones of spreading and near the large platforms of composting or storage of waste.

KEY WORDS

Microbiological risk, risk assessment, QMRA, waste, sludge

Contexte et objectifs

Dans le cadre des Evaluations des Risques Sanitaires, les risques microbiologiques sont plus difficiles à évaluer que les risques chimiques, du fait notamment des relations doses effets moins établies. Pourtant ces approches sont nécessaires pour évaluer les risques des diverses filières de gestion des déchets : compostage, stockage, etc. En effet, celles-ci peuvent émettre des « polluants » microbiologiques, auxquels sont exposés des travailleurs, des populations riveraines, des animaux de production et des végétaux consommés.

L'objectif de la présente étude était de réaliser un état des lieux actualisé des connaissances en matière d'Evaluation des Risques Microbiologiques (ERM) applicables à la filière déchets (une synthèse sur le sujet ayant été publiée en 2007 par l'INERIS) et plus particulièrement de :

- décrire la démarche et les méthodes spécifiques utilisées dans l'ERM en montrant les points communs et les différences par rapport à l'approche développée dans l'évaluation du risque chimique.
- présenter les diverses approches métrologiques développées pour évaluer les expositions et caractériser l'apport des nouvelles techniques moléculaires (PCR et autres).
- décrire les transferts d'agents infectieux dans les différents médias (air, eaux, sols) et chaînes alimentaires (produits animaux et végétaux), les temps de survie et les possibilités de multiplication des agents infectieux dans les différents médias.
- définir une typologie des déchets et de leurs filières de traitement quant au risque microbiologique qu'ils peuvent générer vis-à-vis des populations générales, sachant que les données de santé professionnelles peuvent être exploitées dans ce cadre.
- rapporter les approches pratiques et concrètes actuellement développées par les institutions françaises en matière d'évaluation de risque microbiologique appliquées à la filière déchet.

Le travail réalisé a été avant tout un travail de recherches et d'analyses bibliographiques. Quatre vingt treize articles publiés sur le sujet après 2004 ont été identifiés, dont cinquante (54 %) ont été jugés pertinents et donc inclus dans l'étude. Soixante trois rapports d'institutions ont été publiés après 2004 au niveau international, les plus riches en informations proviennent de l'OMS, du HSE et de l'US-EPA.

Concepts généraux

L'ERM a été élaborée historiquement pour évaluer la sécurité sanitaire de l'eau de boisson et des aliments. Les Directives, émises par le Codex Alimentarius Council (CAC, 1999) qui réglemente la qualité des aliments faisant l'objet d'échanges internationaux, décrivent la réalisation d'une ERM comme la succession de quatre étapes :

- 1- Identification des dangers (avec généralement en préalable, la formulation du problème),
- 2- Caractérisation des dangers,
- 3- Estimation de l'exposition,
- 4- Caractérisation du risque, synthétisant les trois étapes précédentes.

Cette démarche est fortement inspirée de celle appliquée à l'évaluation de risque chimique. Cependant, les microorganismes se distinguent fondamentalement des substances chimiques, principalement par leur capacité à se multiplier dans l'environnement et pour certains d'entre eux, dans les organismes humains (hôtes). De plus certains agents peuvent aussi se transmettre d'individus à individus (transmission secondaire). Par ailleurs, certains individus peuvent développer une immunité contre des agents. Par conséquent, certaines étapes nécessitent des approches et des méthodologies spécifiques au risque microbiologique. Un travail systématique de comparaison des approches chimiques et microbiologiques est présenté dans le rapport d'étude.

Cette démarche a donc subi des évolutions. En 2000, l'ILSI a proposé un cadre revisité en trois phases (à noter que cette démarche n'a pas encore été développée à part entière par les institutions de référence) :

- 1- formulation du problème (description des agents pathogènes, des matrices, des voies d'exposition etc.),
- 2- phase d'analyse : caractérisation de l'exposition et des effets sur la santé humaine,
- 3- phase d'interprétation ou de caractérisation du risque.

Selon les objectifs affichés et les résultats escomptés, trois types d'ERM sont pratiquées: qualitative, semi-quantitative et quantitative (EQRM).

L'ERM qualitative présente des résultats sous une forme descriptive ou catégorielle (risque de niveau élevé, moyen, modéré, négligeable, etc.). C'est généralement un outil suffisant d'aide à la décision. C'est d'ailleurs, dans la pratique, le type d'ERM le plus souvent pratiqué. Ce type de démarche formalisée par le Codex Alimentarius Council (CAC, 1999) a été appliqué par exemple, par l'OMS pour la classification des risques résultant du rejet d'eaux usées sur les côtes en fonction du type de traitement (primaire, secondaire, désinfection, etc.) et de la configuration du rejet (rejet direct, émissaire court, émissaire long).

L'ERM semi-quantitative permet quant à elle de hiérarchiser un grand nombre de risques sans passer par les calculs numériques fastidieux de l'ERM quantitative. Cette approche est développée de préférence lorsque l'on cherche à classer/prioriser les actions de réduction des risques et/ou que l'on doit décider des ressources (financement, ressources humaines, etc.) à attribuer aux actions. Un exemple connu d'utilisation d'ERM semi-quantitative est l'établissement de profils de risque d'un grand nombre d'infections alimentaires par les Autorités sanitaires de Nouvelle-Zélande.

Comme pour les autres ERM, l'EQRM revient à appréhender, de manière quantitative cette fois-ci, et à combiner d'une part la probabilité d'un aléa sanitaire (problème de santé lié à l'exposition à un agent pathogène sanitaire d'origine microbiologique) et d'autre part, la gravité de cet aléa.

Les étapes cruciales de l'EQRM sont la construction du modèle dose-réponse (caractérisation du risque) et l'estimation des expositions qui sont toutes deux marquées par un caractère aléatoire, et une variabilité inhérente à la nature biologique des phénomènes, propriétés qu'il faut savoir distinguer de l'incertitude liée à l'observateur extérieur et qui reflète le niveau de confiance que l'on place dans une mesure ou une hypothèse de travail. Des modèles dits de second ordre permettent de distinguer la variabilité, de l'incertitude. S'il s'agit de construire entièrement le modèle dose-réponse, devant l'ampleur de la tâche, les auteurs se contentent généralement d'un seul agent pathogène par étude.

Caractéristiques et spécificité de l'ERM

Etant donné la complexité des phénomènes impliqués et les nombreuses interactions possibles entre pathogènes/matrices/populations cibles, la revue systématique de différents paramètres (pathogènes pertinent, mode d'exposition, nature des effets sanitaires, population cible, transmission intra-population etc.) permet de mieux formuler l'énoncé du problème et la méthodologie pertinente à développer.

Concernant le danger, l'agent biologique pathogène peut être infectieux ou non (endotoxines, bêta-(1-3)-D-glucane, peptidoglycane). Pour ces derniers (agent biochimique), l'évaluation du risque peut se faire selon l'approche classique appliquée aux substances chimiques toxiques à condition que la concentration d'exposition soit estimable sans qu'il soit nécessaire de connaître les conditions de développement du microorganisme qui l'a produit.

Les divers agents biologiques infectieux (bactéries, virus, champignons (mycètes), protozoaires, helminthes, protéines infectieuses ou prions) appartiennent à des catégories d'êtres vivants parfois très éloignés génétiquement et sont décrits dans le rapport. Comme il existe des listes de substances toxiques répertoriées dans des bases de données, des listes de microorganismes pathogènes ont été dressées (ex : Directive européenne 2000/54/CE qui a de plus établi un classement en quatre groupes de risque selon l'importance du risque d'infection qu'ils présentent).

L'effet sanitaire adverse lié à un agent biologique est généralement consécutif à la pénétration et à la multiplication (infection) de cet agent au sein de l'organisme hôte (corps humain). L'effet clinique qui en résulte peut revêtir diverses formes (maux de tête, diarrhée, etc.), durées (aiguë, subaiguë, chronique) et niveaux de gravité. En matière d'EQRM, la caractérisation du risque s'arrête le plus souvent au niveau de l'infection.

La matrice, milieu qui porte les agents pathogènes, peut être à l'état solide (viande, végétaux, boues séchées, compost, etc.), liquide (eau de boisson, lait, lisiers etc.) ou encore dispersé dans l'air. La distinction entre ces différents états n'est pas toujours nette pour certaines matrices hétérogènes telles que les boues liquides ou les aérosols constitués d'air et de particules. Par ailleurs, les matrices solides et semi-solides (aliments, boues) sont connues pour l'hétérogénéité de la répartition de leurs germes, avec des différences de plusieurs ordres de grandeur d'un échantillon à un autre.

La matrice influence sur les conditions de survie et éventuellement de multiplication des agents. En milieu sec et froid, les aérosols perdent rapidement les bactéries qu'ils portent à l'origine. Par contre, certains milieux tels que les boues ou les fèces animales peuvent être propices à la multiplication de

germes. Les possibilités de transferts des agents varient aussi d'une matrice à une autre. Par exemple, les aérosols sont par nature très propices à être déposés sur le sol ou les végétaux.

Certaines caractéristiques de la population humaine susceptible d'être exposée peuvent influencer sa sensibilité vis à vis d'un agent pathogène donné, au niveau de son infectiosité ou au niveau de l'expression de sa virulence (exemple : état immunitaire, stress, traitements médicamenteux etc.). Leur connaissance sera essentielle à l'élaboration d'une ERM rigoureuse.

Les voies d'exposition pertinentes pour l'ERM sont l'ingestion orale, l'inhalation et la pénétration transcutanée. L'ingestion orale est de très loin la voie la plus étudiée (domaine alimentaire). L'exposition par inhalation est essentiellement traitée pour les effets des endotoxines et des substances allergènes, dans le cadre de la santé professionnelle dans la filière déchet : ramassage, triage et surtout plateformes de compostage. En ce qui concerne les agents infectieux, l'exposition par inhalation a été prise en compte dans le cas de l'épandage de boues liquides, des établissements d'élevage, des silos à grains, de certaines industries agro-alimentaires et du textile et de celui du terrorisme biologique.

Parmi les agents non infectieux, seules les endotoxines ont fait l'objet d'un modèle dose-réponse pour l'inhalation, qui est en fait un modèle pour un agent chimique. Une publication récente affirme qu'aucun véritable modèle dose-réponse par inhalation n'a été élaboré pour un agent infectieux. En réalité, les ERM prenant en compte cette voie d'exposition pour les bactéries et les virus ont considéré qu'une partie (généralement 10 %) de la dose de microorganismes inhalée était ingérée après transport vers le tube digestif par l'escalator muco-ciliaire. Elles ont appliqué à cette fraction un modèle dose-réponse par ingestion orale. Il existe cependant quelques rares exceptions (coxsackievirus A21 et *Bacillus anthracis*). L'exposition par voie cutanée ne semble pas avoir fait l'objet d'ERM.

Dans le cas d'agents biochimiques, la prise en compte des expositions aiguë et chronique est pertinente, et les effets liés à ces deux durées d'exposition sont bien connus pour les endotoxines.

Dans le cadre d'une ERM liée à l'ingestion, les modèles dose-réponse considèrent l'exposition comme un épisode instantané et unique à la survenue de l'infection. Si l'infection ne se produit pas, cela impliquera a priori que le pathogène ne se multipliera plus dans l'organisme hôte. Le risque d'infection est donc « remis à zéro » jusqu'au prochain événement d'ingestion d'un pathogène. Cette démarche est cohérente si les événements à risque d'ingestion sont suffisamment espacés dans le temps. Dans le cas d'une exposition par inhalation, la durée de l'épisode d'exposition peut être plus longue, par exemple 8 heures s'il s'agit d'une exposition professionnelle, voire chronique. L'exposition chronique à un agent infectieux est difficile à conceptualiser, si ce n'est par une longue série d'expositions indépendantes répétées. Dans ce cas, on peut intégrer la dose sur la durée de chaque épisode d'exposition, par exemple en multipliant la concentration du germe dans l'air par le volume inhalé ($20 \text{ m}^3/\text{j}$ en moyenne).

D'autre part, l'exposition répétée, ou même unique, peut favoriser le développement chez l'hôte d'une immunité acquise à certains agents infectieux, ce qui est encore une spécificité de ce type d'agents face aux agents chimiques (OMS, 2004).

Les données de base pour la construction de modèles dose-réponse sont issues d'informations sanitaires de différents types (épidémiologie, études cliniques, modèle animal, etc.). Dans l'ERM actuelle, les modèles dose-réponse intègrent l'hypothèse selon laquelle, les mécanismes d'infection sont considérés « sans seuil » (refus du concept de dose minimale infectante). Ils estiment également indépendantes les actions des agents infectieux pénétrant un organisme. Les risques (probabilité) d'infection sont estimés soit à l'aide de modèles de type Bêta-Poisson, soit à l'aide de modèles de type exponentiel selon que l'on considère hétérogènes ou homogènes les interactions pathogène-hôte.

Eu égard notamment à la variabilité et la complexité des phénomènes biologiques, la prise en compte de la variabilité et de l'incertitude ne peuvent être occultées dans l'ERM. Aussi, les résultats sont souvent présentés sous forme de faisceau de courbes, nuages de points ou valeurs incluses dans des intervalles de confiance. Pour ce faire, le recours aux techniques de simulation de Monte Carlo est à présent quasi systématique.

Il n'existe pas à notre connaissance de critères consensuels de décision pour le risque microbiologique comme il en existe en matière de risque chimique (Quotient de Danger < 1 et Excès de Risque Individuel < 10^{-5}). Le risque de 10^{-4} infection par personne et par an a été proposé pour l'eau de boisson aux Etats-Unis, mais jugé irréaliste face aux données épidémiologiques nationales.

Transfert et survie des germes dans les différents compartiments environnementaux

Les agents infectieux sont émis et transportés dans l'air sous forme d'agents individuels (corps bactériens, spores), d'agents agglomérés, ou d'agents fixés sur des particules minérales (sol) ou organiques (fins débris végétaux) ou sur particules liquides (embruns). Les niveaux de fond de bactéries et de champignons sont généralement d'environ 1000 UFC/m³. A proximité des activités d'émissions importantes de sites de compostage, les concentrations en bactéries et champignons, prises à hauteur d'homme, peuvent dépasser 1 million d'UFC/m³. Ces comptages diminuent rapidement lorsqu'on s'éloigne, sous le vent de ces activités, pour se rapprocher des niveaux de fond à partir d'une distance de 50 à 200 m.

Aucune étude n'a été identifiée caractérisant la durée de vie dans l'air des bactéries issues des déchets mais les échantillonnages d'aérosols à plusieurs centaines de mètres sous le vent des sites de compostage confirment qu'une partie d'entre elles survivent et restent cultivables à cette distance. L'épandage de boues de station d'épuration (STEP) sur le sol peut également être à l'origine d'une émission des agents pathogènes dans l'air. Mais en fait, la zone d'influence reste limitée à quelques mètres autour du point d'épandage, limitant le risque essentiellement à l'opérateur.

La remise en suspension de sol amendé par des boues nécessite une vitesse de vent relativement élevée, et peut être estimée quantitativement par des équations appliquées à l'érosion éolienne des sols qui font intervenir de nombreux facteurs (humidité du sol, densité et nature couverture végétale, etc.). Ce type de contamination potentielle ne semble pas particulièrement ciblé par les études qui se concentrent surtout sur l'aérosolisation des boues pendant l'application. La durée de vie relativement courte des germes pathogènes à la surface du sol limite vraisemblablement fortement les risques liés à l'érosion éolienne.

La dispersion atmosphérique des aérosols émis par les activités de compostage ou d'épandage de boue, assimilés à des particules fines (PM10), peut être simulée par les logiciels habituels de modélisation de dispersion atmosphérique (modèle gaussiens par exemple).

Les stations d'épuration peuvent également engendrer, des émissions de fines gouttelettes d'eau usée dans l'atmosphère, notamment au niveau des dispositifs d'aération (boues activées, chenaux d'oxydation, etc.).

Le transfert des germes pathogènes associés aux déchets vers le sol se fait, soit par déposition des aérosols décrits précédemment, soit par épandage de boue, cette dernière activité entraînant, de loin, le dépôt du plus grand nombre de germes pathogènes de toutes catégories.

La durée de vie des germes dans le sol dépend des espèces, du mode de dépôt et également de la matrice dans laquelle les germes peuvent subsister et qui dans certains cas (boues solides) ne s'incorporent au sol qu'après une homogénéisation anthropique (labour ou autre travail du sol) et/ou naturelle (rôle prépondérant de la mésofaune). Des données existent pour différentes catégories d'agents pathogènes (ex : entre 2 mois et 1 an pour des bactéries, 2 à 7 ans pour des helminthes). Ces valeurs sont variables d'une espèce/souche à l'autre et selon les conditions abiotiques (sol et climat) et biotiques (écologie microbienne). La survie des bactéries dépend également de leur faculté à produire des formes de résistances, (endospores des bactéries Gram(+)).

Une fois au contact du sol, les germes pathogènes peuvent subir sous l'action des eaux pluviales, des transports verticaux et horizontaux. La vitesse de percolation est essentiellement liée à la porosité du sol, des phénomènes d'adhérence avec les particules fines du sol (argiles et limons) etc. Par ailleurs, le sol présente une très abondante microflore et microfaune qui concurrence sévèrement, les germes introduits. Les barrières physiques et biologiques sont telles que la contamination de nappes phréatiques par les germes pathogènes apportés par l'épandage de boue est considérée comme très limitée et peu préoccupante.

Lorsque la pluie est trop importante, les pathogènes présents à la surface du sol subissent un déplacement horizontal qui se termine finalement dans un cours d'eau ou un point d'eau superficielle. Ce transport est modélisable à l'échelle d'un bassin versant, mais cette approche spatiale est généralement restreinte aux pathogènes apportés par l'épandage de produits d'élevage (fumier).

Les facteurs favorisant l'adhésion, voire la colonisation des surfaces des végétaux par les bactéries pathogènes pour l'homme ont été bien décrits. La durée de vie sur les plantes est généralement plus courte que dans les sols, ce qui s'explique probablement par une exposition plus importante aux UV et à la dessiccation (entre 1 et 6 mois pour les bactéries, 1 et 5 mois pour les helminthes).

De nombreux agents infectieux pathogènes pour l'homme sont capables d'infecter des animaux d'élevage vivants et également de se multiplier dans les produits animaux consommés par l'homme tels que la viande, les œufs ou les produits laitiers. Les maladies animales transmissibles à l'homme, et vice-versa, sont appelées zoonoses. Les risques de contamination des produits par des agents

infectieux lors des différentes étapes qui relient « la ferme à la fourchette », ont fait l'objet de nombreux travaux.

Apport des nouvelles techniques de détection et de quantification des germes à l'évaluation de risque microbiologique

Les méthodes d'identification et de quantification des agents infectieux ont connu des avancées significatives durant les dernières décennies avec le développement des techniques d'amplifications géniques (PCR) étant données leurs performances en termes de spécificité, de seuil de détection et de rapidité. Ces techniques ayant été beaucoup développées pour les microorganismes pathogènes des aliments et des eaux de boisson, le matériel génétique de référence est en conséquence disponible depuis quelques années pour la grande majorité des souches de bactéries, virus et protozoaires pathogènes connus des déchets.

Les déchets constituent des matrices complexes riches en matière solides et susceptibles de contenir des substances interférant avec ou inhibant l'amplification génique. Ces contraintes méthodologiques sont désormais assez bien maîtrisées mais elles affectent encore les limites de détection des germes. Des enrichissements préalables doivent par ailleurs être souvent réalisés (peu de germes présents). La PCR est également appliquée sur des prélèvements d'aérosols.

La quantité de matière génétique fournie par la PCR quantitative peut être ensuite convertie en nombre de cellules bactériennes ou de spores de champignon par m³ d'air, même s'il n'y a pas d'équivalence exacte avec les classiques « Unités formant colonies » (UFC). Pour les bactéries comme pour les champignons, les résultats obtenus par PCR quantitative peuvent être supérieurs à ceux mesurés par les techniques basées sur les cultures.

Les techniques de puces ADN et biocapteurs sont très prometteuses pour la fourniture d'outils très spécifiques et bien adaptés aux activités de détection des pathogènes en routine.

Evaluation de risque microbiologique dans les filières de traitement des déchets

La recherche bibliographique exhaustive qui a été réalisée montre que l'information disponible sur l'impact sanitaire de la filière déchet sur les populations générales est focalisée quasi exclusivement sur les manipulations de déchets bruts et transformés sur les plateformes de compostage, et sur l'épandage de boues résiduaires stabilisées non hygiénisées sur les sols.

Les activités de collecte, tri, dépôts et autres valorisation de déchets municipaux ont été essentiellement étudiées sous l'angle de la santé professionnelle. En fait, il s'avère que les problématiques d'ERM développées pour les activités de compostage et d'épandage de boues d'épuration sont applicables aux autres activités pertinentes de la filière déchet.

Evaluation de risque microbiologique dans le cas des plateformes de compostage **Identification des dangers**

Les études sur les bioaérosols de compost ne recherchent pas particulièrement d'espèces ou de souches déterminées de bactéries ou de champignons pathogènes, mais les mesurent plutôt globalement, comme indicateurs de nuisance. Seul le champignon *Aspergillus fumigatus*, responsable d'aspergillose pulmonaire est parfois spécifiquement ciblé. Les agents pathogènes des aérosols issus du traitement des déchets sont connus pour provoquer principalement des effets respiratoires.

Estimation des expositions

L'impact des sites de compostage et plus généralement de traitement des déchets est avant tout axé sur les émissions et concentrations atmosphériques d'agents biologiques infectieux et non infectieux. Les contaminations des sols, d'eaux superficielles et souterraines semblent n'intéresser que les substances chimiques.

Des campagnes de mesures réalisées au Royaume-Uni ont montré des concentrations de bactéries totales et champignons mesurées au vent des sites de compostage inférieures à 1000 UFC/m³ (niveaux de fond). Près des sites de manipulation du compost, les employés peuvent être exposés à des niveaux >100 000 UFC/m³ de bactéries ou champignons, et environ 30 % des prélèvements de bactéries et 10 % des prélèvements de champignons ont dépassé 1 million UFC/m³.

Les concentrations en bactéries et champignons diminuent très rapidement sous le vent des sites de manipulation du compost avec au-delà de 50 m, des concentrations inférieures au niveau de fond (les sites confinés ne semblent pas montrer d'émissions atténuées de bactéries et de champignons par rapport aux procédés ouverts).

Ces résultats concordent avec une étude de modélisation qui a montré que les niveaux de fond sont atteints au-delà d'une distance de 100 m des sites de compostage. La plupart des études révèlent une absence d'influence des sites de compostage au-delà de 200 m, même si quelques rares études allemandes ont montré une influence visible à plus de 800 m, avec des concentrations de bactéries supérieures à 100 000 UFC/m³ à 200 m de distance.

Près des sites de manipulation de compost, des concentrations d'endotoxines mesurées par équipements individuels s'élèvent jusqu'à 20 000 EU/m³, mais la plupart des études donnent des concentrations maximales <2000 EU/m³. Pour les endotoxines, le niveau de 1 EU/m³ est généralement considéré comme maximum dans les villes d'Europe et d'Amérique du Nord.

Les données sur les concentrations d'endotoxines dans l'air au-delà des limites des sites de compostage sont très rares. Des concentrations maximales de 2,3 EU/m³ ont été mesurées à proximité des postes de manipulation du compost alors que les concentrations au vent des installations étaient inférieures au seuil de détection (0,15 EU/m³). Les concentrations ont atteint 1,7 EU/m³ en limite de site et 0,2 EU/m³ à 80 m de distance sous le vent de l'installation. De manière inattendue et inexplicite, les niveaux d'endotoxines remontaient à 0,7 EU/m³ à 100 et 150 m de distance sous le vent.

Relations dose-réponse

Il n'a pas été encore élaboré de modèle dose-réponse pour *Aspergillus fumigatus*, qui est la seule espèce de microorganisme pathogène étudiée spécifiquement dans le cas des installations de compostage. Une relation dose-réponse (la seule) de type Valeur Toxicologique de Référence (VTR) à seuil a été construite pour l'exposition par inhalation aux endotoxines (50 EU/m³). Pour les microorganismes, des données de relation exposition-réponse aux bioaérosols de compostage existent dans la littérature (exemple : effets reportés à partir de 10 000 UFC et 1000 spores/m³ chez les employés de la filière déchets).

Caractérisation du risque

Les risques liés aux aérosols sur les unités de compostage ou d'autres traitements de déchets restent préoccupants pour les employés exposés aux fortes concentrations (broyage, mélange, tamisage, mélange, retournement des andains). Le danger n'est par contre pas clairement établi pour les populations riveraines.

Des études de modélisation et des campagnes de prélèvements multi-sites montrent l'efficacité de la distance minimale légale de 250 m dans l'abattement des agents pathogènes alors que d'autres études ont montré une augmentation de ces niveaux à des distances bien supérieures lors d'épisodes climatiques particulièrement favorables.

Les études épidémiologiques portant sur les populations résidant à proximité des sites de traitement des déchets sont très rares. L'une d'elle a néanmoins montré une augmentation significative de la prévalence des irritations respiratoires ressenties (réveil dû à la toux, bronchite, essoufflement, sifflement) chez les populations résidant à 150 – 200 m d'un site de compostage.

Evaluation de risque microbiologique dans le cas de l'épandage de boues

Identification des dangers

En principe, l'ensemble des agents pathogènes se développant dans le tube digestif des hommes et des animaux est susceptible de se retrouver dans les boues non hygiénisées. A ces agents, il faut ajouter des agents pathogènes se multipliant naturellement dans les eaux naturelles ou traitées (telles que les *Legionella*) ou simplement capables de survivre un certain temps dans celles-ci (telles que les protéines infectieuses (prions)).

Certaines de ces bactéries causent des maladies graves (ex. : *E. coli* O157:H7 (gastroentérites hémorragiques), *Listeria monocytogenes*, (méningites, encéphalites, septicémies et infection intra-utérines abortives) etc.). Les virus sont généralement responsables de gastroentérites, hormis les adénovirus responsables de maladies respiratoires, et le virus de l'hépatite A. Les protozoaires sont principalement responsables de maladies diarrhéiques et de douleurs abdominales. Les helminthes sont causes de divers symptômes intestinaux, neurologiques, digestifs etc.

Les champignons ne sont généralement pas pris en compte dans les ERM liées à l'épandage de boues, car celles-ci constitueraient de mauvais substrats de prolifération. Les endotoxines sont prises en compte uniquement dans le cas d'exposition par inhalation de boues liquides durant l'épandage.

Estimation des expositions

Les scénarios ayant fait l'objet d'EQR se résument en fait essentiellement à l'exposition

- par inhalation lors de l'épandage de boues liquides voire solides pour l'agriculteur épandeur et pour les populations riveraines,
- par consommation de végétaux crus et non épluchés, ayant poussé sur du sol amendé,
- par consommation de végétaux feuilles ou racines s'étant développés sur un sol ayant subi la déposition d'aérosols provenant de boues épandues sur un champ voisin,

- par consommation de poussières de sol d'un jardin contaminé par la déposition d'aérosols provenant de boues épandues sur un champ voisin,
- par consommation de poussières de sol d'un jardin contaminé par le sol d'une parcelle amendée, transporté par érosion hydrique et éolienne.

Les variabilités spatiale et temporelle de la présence d'agents pathogènes dans les boues rend difficile leurs quantifications. Plusieurs méthodes existent pour approcher ces concentrations. Par exemple, celle consistant à appliquer des facteurs d'abattement (suite aux traitements) aux concentrations dans le substrat d'origine. Une autre approche est basée sur un enchaînement d'hypothèses remontant jusqu'à l'origine de la contamination, cette démarche a été adoptée pour la plupart des EQRM concernant la sécurité alimentaire.

A partir des concentrations d'agents pathogènes dans les boues, les concentrations dans les médias d'exposition (air, sol végétaux et autres) peuvent être estimées par des équations de transferts combinées à des coefficients de survie.

Relations dose-réponse

Des modèles dose-réponse, ou plus précisément dose-infection, ont été élaborés pour l'exposition par ingestion de nombreux agents infectieux que l'on peut retrouver dans les boues (*E. coli* O157:H7, *E. coli* O55, *E. coli* O111, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* spp. ; Rotavirus, Entérovirus, Coxsackievirus B3, Adénovirus, Virus hépatite A ; *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* ; *Ascaris lumbricoides* ; prions).

En ce qui concerne l'exposition par inhalation, seul le Coxsackievirus A21 et les endotoxines ont fait l'objet d'un modèle dose-réponse (sachant tout de même que les modèles dose-réponse par ingestion peuvent être appliqués à l'exposition par inhalation moyennant une réduction de 90 % de la dose absorbée).

Caractérisation du risque

Les EQRM relatives à l'épandage de boues en population générale ont fait l'objet de quelques publications. Ses études sont analysées en détail dans le rapport d'étude. Les risques d'infection individuels sont très variables selon les scénarios :

- l'étude générique française (INERIS, 2007b) portant sur la contamination de jardins potagers par les retombées d'aérosols provenant de l'épandage de boues sur une parcelle voisine, avec des risques individuels de $1,8 \cdot 10^{-2}$ (1,8 %) pour *Salmonella* spp., de $2,1 \cdot 10^{-4}$ pour *E. coli* O157:H7 et de $4,4 \cdot 10^{-3}$ pour *Cryptosporidium parvum*. Cette étude fait l'objet d'un travail critique approfondi dans le rapport d'étude.
- l'étude expérimentale américaine (Brooks et al., 2005) portant sur la modélisation de la dispersion de bactériophages suite à un épandage de boues liquides. Le modèle de dispersion appliqué ensuite de manière générique à l'exposition par inhalation au Coxsackievirus permet de calculer un risque d'infection compris entre 10^{-5} et 10^{-7} par exposition (8 h/j) pour les riverains résidant à 30 m de la parcelle d'épandage.
- l'étude nationale américaine (Brooks et al., 2005) portant sur l'inhalation d'aérosols provenant du chargement ou de l'épandage de boues sur une parcelle située à 30 m, avec des risques individuels variant entre 10^{-4} et 10^{-6} pour Coxsackievirus et *Salmonella* spp.
- l'étude générique anglaise (Gale, 2005), portant sur l'ingestion de végétaux cultivés sur sols amendés avec des boues non hygiénisées, pas même stabilisées, en respectant la réglementation en vigueur, avec des risques individuels allant de $4,3 \cdot 10^{-5}$ pour *Giardia* spp. à $7,5 \cdot 10^{-11}$ pour *E. coli* O157:H7.
- l'étude mexicaine (Navarro et al., 2009) portant sur l'ingestion de légumes cultivés sur des sols amendés par des boues au standard OMS pour les helminthes, avec des risques individuels (consommation hebdomadaire) compris entre 10^{-2} et 10^{-5} .

Certains de ces risques peuvent paraître relativement alarmants vis-à-vis des seuils d'intervention adoptés en matière de risque chimique (10^{-5} pour les effets sans seuil de dose), d'autant plus que les germes impliqués peuvent être à l'origine de maladies relativement graves (par exemple *E. coli* O157:H7), même chez les sujets immunocompétents. De tels seuils d'intervention ne sont cependant pas appliqués de manière consensuelle en ce qui concerne le risque microbiologique.

Conclusion et perspectives

Si les exemples d'EQRM sont relativement nombreux dans le domaine de la sécurité alimentaire (aliments et eaux de boisson), les EQRM appliqués à la filière déchets concernent essentiellement l'épandage de boue d'épuration et les plateformes de compostage des déchets, qui sont les principales sources d'exposition des populations générales. Lorsque qu'une exposition multimédia est envisagée, par exemple dans le cas d'épandage des boues, les incertitudes apparaissent notamment au niveau des coefficients de transfert entre milieux et de survie dans les différents milieux, fragilisant les résultats

quantitatifs obtenus, comme c'est le cas de l'étude française sur l'épandage agricole de boues d'épuration non hygiénisées (INERIS, 2007).

Les besoins en matière de recherche sur la problématique du risque microbiologique pour la population générale vis-à-vis de la filière déchets concernent en priorité le renforcement des connaissances permettant de réduire les incertitudes afférentes aux différentes étapes de l'EQRM et d'autre part, notamment l'applicabilité au domaine microbiologique des connaissances sur les transferts de milieu et leur modélisation, par exemple :

- le transport de sol par érosion pluviale au niveau d'une parcelle ou d'un bassin versant,
- la mise en suspension de particules de sol sous l'effet du vent à partir d'une source d'émission plane ou volumique,

Des études épidémiologiques pourraient également s'avérer profitables à proximité des zones d'épandage et des grandes plateformes de compostage ou de stockage des déchets. Cependant, étant donné les nombreux facteurs de confusion à prendre en compte (perception des odeurs, etc.), une étude de faisabilité préalable s'avère absolument nécessaire afin de définir les protocoles pertinents. A priori, une étude de type panel au niveau de la population riveraine d'une plateforme de traitement/compostage des déchets, permettrait de rechercher l'association des données d'émission de particules (modélisation, capteurs, etc.) à des indicateurs sanitaires en tenant compte des nombreux facteurs de confusion.

Context and objectives

In the scope of health risk assessment, the microbiological risks are more difficult to assess than the chemical ones, especially because of the not well defined dose-response relationships.

However, these technical assessments are essential to know the potential risks of waste industry (composting, storage, etc.). Indeed, this industry can release microbiological "pollutants", to which are exposed workers, neighbouring populations, animals and plants for human consumption.

The objective of this study was to update existing knowledge on Microbiological Risk Assessment (MRA) in the scope of waste management (a synthesis on the subject having been published in 2007 by the INERIS) and more particularly:

- to describe the specific methods used in the MRA, with the common and the different points compared to the methods developed in the chemical risk assessment.
- to describe the metrological approaches developed to evaluate the exposures and to characterize the contribution of the new molecular techniques (PCR and others).
- to describe the transfers of infectious agents in the various media (air, water, soils) and food chains (livestock products and plants), survival times and the possibilities of multiplication of the infectious agents in the various media.
- to define a typology of waste and waste industry towards the microbiological risk they can generate for general population (knowing that occupational data can be used).
- to present the practical and concrete approaches currently developed by the French institutions as regards MRA applied to the waste industry.

Work carried out was for the most part, a literature review. Ninety-three publications on the subject after 2004 were identified, whose fifty (54%) of them were considered to be relevant and thus included in the study. Sixty three reports of institutions were published after 2004 at the international level; the more relevant coming from WHO, HSE and US-EPA.

General concept

The MRA was historically established to assess the health risks associated with drinking water and food. The Directives of the Codex Alimentarius Council (CAC, 1999) which regulates the quality of food in the case of international exchanges, describe MRA as the succession of four phases:

- 1- Hazards identification (generally preceded by the problem formulation phase),
- 2 - Characterization of the hazards,
- 3 - Estimate of the exposure,
- 4 - Characterization of the risk, synthesizing the three preceding phase.

This technical approach is strongly modelled on what applied to the chemical risk assessment. However, the microorganisms are basically different from the chemical substances, mainly by their capacity to multiply in the environment and for some of them, in the human organisms (hosts). Moreover some agents can also spread from person to person (secondary transmission). In addition, some people can develop immunity to these agents. Consequently, some phases need approaches and methodologies, specific to the microbiological risk. A systematic comparison between the chemical and microbiological approaches is presented in the study report.

This microbiological approach thus underwent evolutions. In 2000, the ILSI proposed a revisited model in three phases (model which is still not adopted by leading institutions):

- 1- problem formulation (description of the pathogens, the matrices, the routes of exposure etc.),
- 2 - phase of analysis: characterization of the exposure and the effects on human health,
- 3 - phase of interpretation or characterization of the risk.

According to the stated objectives and expected results, three types of MRA are practised: qualitative, semi-quantitative and quantitative (QMRA).

In the qualitative MRA, results are presented in a descriptive form or categorical one (high level, medium, low etc). It is generally a sufficient aid for decision-making. In practice, this type of MRA is the most used. The qualitative MRA, formalized by the Codex Alimentarius Council (CAC, 1999) was applied for example, by the WHO for the classification of risks resulting from the wastewater discharge on the coasts according to the type of treatment (primary, secondary, disinfection, etc) and from the configuration of the discharge (directly into water, short or long emissary).

The semi-quantitative MRA allows prioritizing the risks without the complicated numerical work required in the QMRA. This approach is developed especially to rank/prioritize the actions of risk reduction and/or to fix the resources attribution for defined action (financing, human resources, etc). A

well-known use of semi-quantitative MRA is the establishment of profiles of risk for a great number of food infections by the medical Authorities of New Zealand.

As for the other MRA, the QMRA combines, in a quantitative way this time, on one hand the probability of a health risk (involving the exposure to a microbiological pathogen) and on the other hand, the severity of this risk. The important steps of QMRA are the construction of the dose-response model (risk characterization) and the exposure assessment, knowing that both are marked by randomness and variability due to the biological nature of the phenomena, properties that must be distinguished from uncertainty related to the observer (uncertainty which reflects the degree of confidence attributed to a measurement or a working hypothesis). Variability and uncertainty can be distinguished using a model, known as second order model. In publications, if the dose-response model must be completely developed, then the authors focus on one pathogen only.

Characteristics and specificities of the MRA

Being given the complexity of the implied phenomena and the many possible interactions between pathogens/matrices/target populations, the systematic review of the various parameters (relevant pathogens, routes of exposure, nature of health effects, target population, intra-population transmission etc.) allows for a better problem formulation and the development of a relevant methodology.

Concerning the hazards, the pathogenic biological agent can be infectious or not (endotoxins, beta (1-3) - D-glucane, peptidoglycane). For the latter (biochemical agent), the risk can be assessed according to the traditional toxic chemical approach provided that the exposure concentration is estimable without the need to know the development conditions of micro-organism which produced it.

The various infectious biological agents (bacteria, virus, fungi (mycetes), protozoa, helminths, infectious proteins or prions) belong to categories, sometimes very different genetically; they are presented in the report. As there are toxic lists of substances indexed in data bases, pathogens lists of micro-organisms were drawn up (e.g.: European directive 2000/54/CE which moreover ranks the pathogens in four groups according to the severity of infectious risk).

The adverse health effect related to a biological agent follows generally the penetration and the multiplication (infection) of this agent within the host (human body). The clinical effect which results from that, can take various forms (headaches, diarrhoea, etc), durations (acute, subacute, chronic) and levels of severity. In most QMRA, the risk characterization generally stops at the level of infection.

The matrix which carries the pathogens, can be in a solid state (meat, plants, dried sludge, compost, etc), liquid (drinking water, milk, manures liquid etc) or dispersed in the air. The distinction between these various states is not always clear for some heterogeneous matrices such as liquid sludge or aerosols (air and particles). In addition, the solid and semi-solid matrices (food, sludge) are known for the heterogeneity of the germs distribution, with differences of several orders of magnitude of a sample to another.

The matrix influences the conditions of survival and the possibility of multiplication of pathogens. In dry and cold media, the aerosols quickly lose the bacteria which they first carry. On the other hand, certain media such as sludge or faeces can be positive for the germ growth. The possibilities of transfers of the agents vary also from one matrix with another. For example, the transfers of aerosols toward the soil or the plants are by nature very supportive.

Certain characteristics of the human population likely to be exposed can influence its sensitivity to a given pathogen; they may influence the infectivity or the virulence level (e.g.: immunizing state, stress, drug treatments etc). Their knowledge will be essential to develop a rigorous MRA.

The relevant routes of exposure for the MRA are oral ingestion, inhalation and skin penetration. Oral ingestion is the most studied route by far (food scope). The exposure by inhalation is primarily treated for the effects of endotoxins and allergens, as part of the occupational health in waste management: collecting, sorting and especially composting. The exposure to the infectious agents by inhalation was taken into account in the case of the spreading of liquid sludge, grain silos, breeding, food and textile industries and biological terrorism.

Among the non-infectious agents, a dose-response model for the inhalation was developed only for endotoxins (which is in fact a model for a chemical agent). A recent publication revealed that no true dose-response model by inhalation was worked out for an infectious agent. Actually, MRA taking into account the inhalation route for bacteria and viruses considered that a part (generally 10%) of the amount of inhaled micro-organisms was transported towards the digestive tract. They applied to this

fraction a dose-response model for oral ingestion. There are however some exceptions (coxsackievirus A21 and Bacillus anthracis). It seems that no MRA was developed for dermal exposure.

In the case of biochemical agents, acute and chronic exposures are relevant, and the effects related to these two types of exposure durations are well-known for endotoxins.

For a MRA related to ingestion, the dose-response model considers the exposure as an instantaneous and single episode at the onset of the infection. If the infection does not occur, that will imply a priori that the pathogen will not multiply any more in the host. The infection risk is thus considered to be zero until the next pathogenic ingestion. This hypothesis is coherent if the ingestion events at risk are sufficiently spaced in time. In the case of an exposure by inhalation, the duration of the exposure can be longer, for example 8 hours for occupational exposure, even chronic. The chronic exposure to an infectious agent is difficult to conceptualize, except by long and repeated independent exposures. Then, concentrations of exposure durations can be assessed for example by multiplying the concentration of the germ in the air by the inhaled volume ($20 \text{ m}^3/j$ on average).

Furthermore, by repeated or even single exposures, the host can develop an acquired immunity with certain infectious agents, which is a specificity not observed with the chemical agents (WHO, 2004).

The baseline data for the construction of dose-response models result from health information of various types (epidemiology, clinical studies, animal model, etc). In the current MRA, the models integrate the hypothesis that the mechanisms of infection are considered "without threshold" (refusal of infecting minimal dose concept). They consider also the actions of the infectious agents as independent. The infection risks (probability) are estimated either using Beta-Poisson models (if the interactions pathogenic-host are considered heterogeneous) or exponential models (if the interactions pathogenic-host are considered homogeneous). Considering the variability and the complexity of the biological phenomena, the variability and uncertainty must be taken into account in the MRA. Also, the results are often presented in the form of beam of curves, scatter plots or values included in confidence intervals, and the technique of Monte Carlo simulation are now quasi systematically used. There is to our knowledge no consensus-originated set of decision criteria for microbiological risk as for chemical risk (hazard quotient < 1 and individual risk excess $< 10^{-5}$). The risk of 10^{-4} infection per person and per year was proposed for the drinking water in the United States, but was considered unrealistic given the national epidemiologic data.

Transfer and survival of the germs in the various environmental compartments

The infectious agents are spread and transported in the air in the form of individual agents (bacterial bodies, spores), of agglomerated agents, or agents fixed on mineral (soil) or organic (plant debris) or on liquid (spray) particles. The background levels of bacteria and fungi are generally around 1000 UFC/m^3 . Near the activities of composting sites, bacteria and fungi concentrations (measured at breast height), can exceed 1 million UFC/m^3 . These counts decrease quickly when moving further away from the site, downwind of these activities, to approach the background rates at 50 to 200 m further.

No study characterizing the lifespan of the waste bacteria in the air was identified but aerosols samplings at several hundred meters downwind of the composting sites confirm that a part of them survive and remain cultivable.

The spreading on the soil of sludge from waste water treatment plant can also generate emission of the pathogens in the air. But in fact, the zone of influence remains limited to a few meters around the point of spreading, limiting the risk primarily to the operator.

The suspension of soil enhanced by sludge requires a relatively high speed of wind, and can be estimated quantitatively by equations applied to wind erosion of soil which utilizes many factors (moisture of the soil, density and natural vegetable coverage, etc). This type of potential contamination does not seem particularly targeted in the studies which concentrate especially on the aerosolisation of sludge during the application. The relatively short lifespan of the pathogens on the surface of the soil probably strongly limits the risks related to wind erosion. The atmospheric dispersion of the aerosols emitted by the activities of sludge composting or spreading, treated as fine particles (PM10), can be simulated by usual software of modelling atmospheric dispersion (model Gaussian for example).

Waste water treatment plant can also generate emissions of fine water droplets in the atmosphere, in particular at the level of ventilation devices (activated sludge, channels of oxidation, etc).

The transfer of the waste pathogens towards the soil is done, either by deposition of the aerosols described previously, or by sludge spreading, this last activity involving, by far, the deposit of the greatest number of pathogens of all categories.

The germs lifespan in the soil depends on the species, the mode of deposit and also on the matrix in which the germs can remain and which in certain cases (solid sludge) are incorporated on the soil only after anthropic homogenisation (cultivation of land) and/or natural (mesofaune). Data exist for various categories of pathogens (e.g.: between 2 months and 1 year for bacteria, 2 to 7 years for helminths). These values are variable according to the species/strain, the abiotic (soil and climate) and biotic (microbial ecology) conditions. The survival of the bacteria also depends on their faculty to produce resistances forms, (endospores for the Gram bacteria (+)). Once in contact with the soil, the pathogens can undergo, under the action of rain water, vertical and horizontal transports. The speed of percolation is primarily related to the porosity of the soil, the adherence forces with the fine particles of the soil (clays and silts) etc. Moreover, the soil contains a very abundant microflora and microfauna that can compete extremely the introduced germs. The physical and biological barriers are such as the contamination of soil water by the pathogenic germs brought by the sludge spreading is considered as very limited and of little concern.

When the rain is too important, the pathogens at the surface of the soil undergo a horizontal displacement which finishes finally in a river or a surface water point. This transport can be modelled on a water catchments area scale, but this spatial approach is generally restricted to pathogens issued from the spreading of livestock products (manure).

The factors supporting adhesion, even the colonization of surfaces of the plants by the human pathogenic bacteria were well described. The lifespan on the plants is generally shorter than in the soils, this is probably explained by a more important exposure to UV and the desiccation (between 1 and 6 months for the bacteria, 1 and 5 months for the helminths).

Many human infectious germs are able to infect livestock and also to multiply in the livestock products consumed by man such as meat, eggs or dairy products. The animal diseases that can spread to human, and vice versa, are called zoonoses. The risks of contamination of the products by infectious agents at the time of the various stages which connect "the farm to the fork", were the subject of many publications.

Contribution of new technologies of germ detection and quantification to the MRA

Infectious germs identification and quantification method progressed significantly the last decades, especially with the improvement of gene amplification, because of their specificity, low limit of analytical determination and their rapidity. These technologies were developed much for the pathogenic micro-organisms of drinking water and food. So the genetic material of reference is available since a few years for the great majority of the waste pathogens.

Wastes are complex matrices, rich in solid matter and likely to contain substances that can interfere with or inhibit genic amplification. These methodological constraints are now rather well controlled but they can still affect the limits of detection of the germs. Moreover, preliminary enrichments must be often carried out (few germs in sample). The PCR is also applied to aerosols samples.

The genetic material provided by the quantitative PCR can be converted into a number of bacterial cells or mold spores per m³ of air, even if there is no exact equivalence with the traditional "Units forming colonies" (UFC). For the bacteria as for fungi, the results obtained by quantitative PCR can be higher than those measured by the techniques based on cultures.

The techniques of DNA chips and biosensors are very promising tools, very specific and well adapted for routine methods.

MRA in waste management

The exhaustive literature review carried out, shows that information available on health impact of waste management on general populations is focused quasi exclusively on handling of raw or composted wastes, and also on the spreading of residual sludges on the soil. Health studies on collecting, sorting, deposits and other recoveries of municipal waste were primarily carried out in occupational settings. But in fact, the methodologies developed for these two kinds of activities can be used for the others fields in waste industry.

MRA in case of composting plant

Hazards identification

The studies on the bioaerosols of compost do not quantify particularly species or strains of pathogenic bacteria or fungi, but rather quantify them overall, like indicators of harmful effects.

Only *Aspergillus fumigatus*, the causative agent of pulmonary aspergillosis, is sometimes targeted. The pathogens of the aerosols resulting from the waste process are known to cause mainly respiratory effects.

Exposure assessment

The impact of waste composting site and more generally of waste process before focused primarily on the emissions and atmospheric concentrations of infectious and non infectious biological agents. The contaminations of soils, of surface water and groundwater seem to interest only the chemical substances.

Series of measurements carried out in the United Kingdom showed concentrations of total bacteria and fungi measured upwind of the composting sites, lower than 1000 UFC/m³ (background levels). Close to the sites, professionals can be exposed to levels >100.000 UFC/m³ of bacteria or fungi, and approximately 30% of the bacteria samples and 10% of fungi samples exceeded 1 000 000 UFC/m³. The bacteria and fungi concentrations decrease very quickly downwind of the sites; they are below the background beyond 50 m (the confined sites do not seem to show attenuated emissions of bacteria and fungi compared to the open ones).

These results agree with a modelling study which showed that the background levels are reached beyond 100 m of the composting sites. Most of the studies reveal no influence of the sites beyond 200 m. However, in some rare studies, bacteria concentrations are higher than 100.000 UFC/m³ at 200 m away from the composting site.

Close to the sites, some endotoxins concentrations monitored by personal equipment rise up to 20.000 EU/m³, but in most studies maximum concentrations are <2000 EU/m³. In European and Nord American towns, 1 EU of endotoxin/m³ is generally considered as the maximum observed concentration.

Only few data exist on the endotoxins concentrations in the air beyond the limits of composting sites. Maximum concentrations of 2.3 EU/m³ were measured near workplaces of compost handling whereas the concentrations upwind of the plant were lower than the detection limit (0,15 EU/m³). The concentrations reached 1.7 EU/m³ at the limit of sites and 0.2 EU/m³ at 80 m away downwind. In an unexpected and unexplained way, the endotoxins levels rose up to 0,7 EU/m³ at 100 and 150 m of the plant downwind.

Dose-response relationship

No dose-response model was still developed for *Aspergillus fumigatus*, which is the only pathogen species studied specifically in the case of composting plant. Only one dose-response relationship was built. It was for the endotoxins exposure by inhalation (50 EU/m³) and it was developed like a toxicological reference value (used for chemical compounds). For the micro-organisms, data on dose-exposure exist in the literature (e.g.: health effects observed at 10.000 UFC and 1000 spores/m³ in professionals of waste management).

Risk characterisation

The risks related to the aerosols in composting units or other waste treatment sites remain alarming for professionals exposed to the high concentrations (crushing, mixture, sifting, etc.). However, the hazard is not clearly established for the neighbouring populations. Modelling studies and multisite monitoring campaigns show the effectiveness of the legal minimal distance of 250 m in the abatement of the pathogens whereas other studies showed an increase in these levels at quite higher distances, particularly during favourable climatic episodes.

The epidemiologic studies relating to the populations living near the sites of processing waste are very rare. But one study showed a significant increase in the prevalence of the respiratory irritations (morning cough, bronchitis, breathlessness and wheezing) in the populations living at 150 - 200 m of a composting site.

MRA in case of sludge spreading

Hazards identification

In theory, all pathogens developing in the digestive tract of humans and animals are likely to be found in not hygienized sludges. To these agents, are added pathogens multiplying naturally in the natural or treated water (such as *Legionella*) or simply able to survive some time in those (such as infectious proteins (prions)).

Some of these bacteria cause serious illnesses (e.g. : *E. coli* O157: H7 (hemorrhagic gastroenteritis), *Listeria monocytogenes*, (meningitis, encephalitis, septicaemias and in utero abortive infection) etc). The viruses are generally responsible for gastroenteritis, but the adenovirus responsible for respiratory diseases and the virus of hepatitis A. The protozoa are mainly responsible for diarrheal diseases and abdominal pains. The helminths are responsible for various intestinal, neurological, digestive

symptoms etc. The fungi are generally not taken into account in the MRA related to the sludge spreading, because those would constitute bad substrates of proliferation. The endotoxins are taken into account only in the case of exposure by inhalation during spreading.

Exposure assessment

The scenarios used in QMRA concern primarily the exposure:

- by inhalation during the spreading of liquid or even solid sludge for the spreading farmer and for the neighbouring populations,
- by consumption of raw and not peeled vegetables, that grew on enhanced soil,
- by consumption of plants (leaves or roots) that grew on soil with aerosols deposit coming from spreading sludge in a nearby field
- by consumption of dust from soil of garden contaminated by the deposition of aerosols coming from spreading sludge in a nearby field,
- by consumption of dust from soil of garden contaminated by the soil of an enhanced parcel, transported by water and wind erosion.

Spatial and temporal variabilities in the presence of pathogens in sludge make difficult their quantifications. Several methods exist to approach these concentrations. For example, the one consisting in applying factors of deduction (following the treatments) to the concentrations in the substrate of origin. Another approach is based on a sequence of assumptions going up until the origin of the contamination; this method was adopted for the majority of the QMRA relating to food safety. From the concentrations of pathogens in sludge, the concentrations in the media of exposure (air, plants and others) can be estimated by equations of transfers combined with survival factors.

Dose-response relationship

Dose-response models, or more precisely dose-infection models, were developed for the oral exposure to many infectious agents found in sludge (*E. coli* O157: H7, *E. coli* O55, *E. coli* O111, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* spp.; Rotavirus, Enterovirus, Coxsackievirus B3, Adénovirus, Virus hepatitis A; *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*; *Ascaris lumbricoides*; prions).

For the exposure by inhalation, dose-response models were developed only for Coxsackievirus A21 and the endotoxins (knowing that the oral dose-response models can be applied to the inhalation exposure by lowering the intake by 90%).

Risk characterisation

The QMRA on sludge spreading for general population were the subject of some publications (they are analyzed in detail in the study report). The individual risks of infection are very variable according to scenarios:

- the French generic study (INERIS, 2007) include the contamination of vegetable gardens by the aerosols coming from the sludge spreading on a close parcel, with $1,8 \cdot 10^{-2}$ individual risks (1,8%) for *Salmonella* spp., $2,1 \cdot 10^{-4}$ for *E. coli* O157: H7 and of $4,4 \cdot 10^{-3}$ for *Cryptosporidium parvum*. A critical analysis of this study was performed and is presented in the study report.
- the American experimental study (Brooks and al, 2005) developed a dispersion model for the bacteriophages following a sludge spreading. The model was applied then in a generic way to the exposure by inhalation to Coxsackievirus. The risk of infection was between 10^{-5} and 10^{-7} per exposure (8 h/j) for the people living at 30 m of the spreading site.
- the American national study (Brooks and al, 2005) presents the inhalation of aerosols coming from the loading or spreading of sludge on a parcel located at 30 m. The individual risks lay between 10^{-4} and 10^{-6} for Coxsackievirus and *Salmonella* spp.
- the English generic study (Scale, 2005), presents the ingestion of plants cultivated on enhanced soil with not hygienized and not even stabilized sludges (while maintaining compliance with the regulation). Individual risks lay between $4,3 \cdot 10^{-5}$ for *Giardia* spp. to $7,5 \cdot 10^{-11}$ for *E. coli* O157: H7.
- the Mexican study (Navarro and Al, 2009) presents the ingestion of vegetables cultivated on soil enhanced with sludge in compliance with WHO regulation for the helminths. The individual risks (weekly consumption) lay between 10^{-2} and 10^{-5} .

Some of these risks appear relatively alarming when compared to the intervention thresholds adopted for chemical risk (10^{-5} for the no-threshold effect), more especially as the implied germs can causative of serious diseases (for example *E. coli* O157: H7), even in immunocompetent subjects. Such intervention thresholds are however not applied in a consensus-originated way with regard to the microbiological risks.

Conclusion and prospective

If examples of QMRA are numerous in the scope of food safety (drinking water and food), the QMRA applied to waste industry relate primarily to spreading of sewage sludge and to waste composting plants, that are the principal sources of exposure of the general populations. When a multi-media

exposure is considered, for example in the case of spreading of sludge, uncertainties appear in particular on the transfer coefficients between media and survival coefficients in the various media, weakening the quantitative results, as it is the case in the French study on the spreading sewage sludge on agricultural fields (INERIS, 2007).

In the scope of waste industry, the research needs on MRA for the general population relate in priority to the reinforcement of knowledge to reduce uncertainties at various QMRA stages. Moreover it would be important to have knowledge on transfers between media and on their modelling. For instance:

- the transport of soil particles by rain erosion on a parcel or a water catchments area,
- the suspension of soil particles by the wind from a flat or volume emission source.

Epidemiologic studies could also be instructive for populations living near the zones of spreading or waste storage and composting plants. However, as many confusion factors must be taken into account (perception of the odors, socio-economic status, habits etc), a preliminary feasibility study should be absolutely carried out in order to define a relevant protocol. A priori, a panel study would allow studying associations between particulate emission data (modelling, personal monitors etc) and health indicators taking in account potential confusion factors.