

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif aux conclusions de l'autosaisine sur la méthodologie de l'évaluation qualitative des risques liés à la présence de *Clostridium perfringens* dans les Matières Fertilisantes et les Supports de Culture

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (qui reprend, depuis le 1^{er} juillet 2010, les missions de l'Afssa et de l'Afsset) met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

La direction générale de l'Agence a saisi, le 7 août 2008, le Comité d'Experts Spécialisé « Matières Fertilisantes et Supports de Culture » afin qu'il propose une démarche générale pour l'évaluation des risques et des bénéfices pour l'homme, l'animal et l'environnement, pertinente pour les principales classes de matières fertilisantes.

L'analyse de la méthodologie d'évaluation qualitative des risques liés à la présence de *Clostridium perfringens*, un des indicateurs microbiologiques utilisés pour évaluer l'innocuité des Matières Fertilisantes et Supports de Culture, constitue l'une des étapes des travaux réalisés dans le cadre de cette saisine.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'Anses a en charge « l'évaluation des risques et des bénéfices » des matières fertilisantes et supports de culture, dans le cadre des autorisations de mise sur le marché et des homologations. L'arrêté du 21 décembre 1998, fixe les conditions de l'homologation des matières fertilisantes et des supports de culture. Les éléments requis dans les dossiers de demande, tels que mentionnés dans les annexes de cet arrêté comme dans le « Guide pour la Constitution des Dossiers de Demande d'Homologation des Matières Fertilisantes et des Supports de Culture » du Ministère en charge de l'Agriculture (Cerfa n°50644), relèvent d'une vérification de l'innocuité, sur la base de valeurs de référence concernant principalement les éléments traces métalliques, certains micropolluants organiques (HAP et PCB) et des microorganismes (indicateurs, pathogènes et phytopathogènes).

Au regard de l'évolution des connaissances et de la nature des produits soumis à la procédure d'homologation, une réflexion sur l'actualisation de la méthodologie de l'évaluation a été considérée comme nécessaire.

Dans une première étape, un bilan des exigences administratives et scientifiques dérivant des termes de la réglementation en vigueur a été dressé et des recommandations pour établir au mieux l'innocuité et l'efficacité des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (MFSC) dans ce cadre ont été émises. Ces éléments sont publiés sur le site internet de l'Anses sous la forme d'une « Note d'information aux pétitionnaires »¹.

Ensuite, une méthodologie d'analyse qualitative des risques a été mise en œuvre pour ce qui concerne la contamination microbienne, la présence d'agents pathogènes pour l'homme et l'animal représentant une source de dangers majeurs dans les MFSC. L'intérêt et les limites de la recherche et du dénombrement de *Clostridium perfringens*, un microorganisme pathogène considéré également comme un indicateur microbiologique, ont été étudiés et font l'objet du présent avis.

Enfin, les travaux engagés seront ultérieurement clos par des recommandations plus générales sur l'application d'une analyse qualitative des risques liés aux MFSC.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été conduite sur la base d'un rapport réalisé par un groupe de travail *ad hoc* composé d'experts du CES « Matières Fertilisantes et Supports de Culture », d'une personnalité compétente et de scientifiques de la Direction des produits réglementés.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS

1. Introduction

Selon le Code Rural, les matières fertilisantes englobent tous les produits dont l'emploi est destiné à assurer ou à améliorer la nutrition des végétaux ainsi que les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. Les engrais et les amendements en font partie. Les supports de culture quant à eux, sont des produits destinés à servir de milieu de culture à certains végétaux.

Les matières fertilisantes sont de nature très variée en raison de l'origine minérale, végétale ou animale des matières premières entrant dans leur composition. La diversité des procédés de fabrication des matières fertilisantes contribue aussi à cette variété.

Dans le domaine des matières fertilisantes et des supports de culture (MFSC), l'article L 255-3 du Code Rural stipule que les homologations ne peuvent être accordées qu'aux produits qui ont fait l'objet d'un examen destiné à vérifier leur efficacité et leur innocuité à

¹ Note d'information aux pétitionnaires concernant l'homologation des MFSC - Etat des exigences scientifiques - <http://www.anses.fr/Documents/DPR-Ft-MFSC2011-06.pdf>

l'égard de l'homme, des animaux et de leur environnement dans les conditions d'emploi prescrites ou normales.

L'innocuité comporte un volet microbiologique pour lequel un certain nombre de micro-organismes pathogènes (pour l'homme, les animaux et l'environnement) clairement identifiés sont utilisés pour évaluer la qualité microbiologique des produits.

Dans le but de proposer des méthodes de vérification de l'innocuité microbiologique efficaces tout en restant économiquement acceptables et réalisables par des laboratoires de routine, le Ministère en charge de l'Agriculture définit la liste minimum des micro-organismes pouvant être considérés comme témoins caractéristiques de contamination microbienne plus générale.

Parmi ces organismes témoins, *Clostridium perfringens* est l'un des micro-organismes dont le suivi est exigé (dans le cadre de l'homologation et de la norme NF U44-095²). *C. perfringens* est un organisme ubiquiste présent dans le tube digestif d'un grand nombre d'espèces animales et que l'on retrouve communément dans l'environnement du fait de la grande résistance de ses spores dans le milieu extérieur. Dans le Guide pour la Constitution des Dossiers de Demande d'Homologation des Matières Fertilisantes et des Supports de Culture (Cerfa n°50644), la valeur faisant référence est l'absence de *C. perfringens* (spores et formes végétatives) dans 1 gramme de produit. Parallèlement la norme NF U44-095 fixe à 100 ufc³ par gramme de matière brute, le nombre maximal de *C. perfringens* pour un produit destiné aux cultures maraîchères et à 1000 ufc par gramme de matière brute pour les autres cultures, sans que soit précisé si le dénombrement doit porter à la fois sur les formes végétatives et les spores. Quant à la norme NF U44-051 (version 2010) qui régit les amendements organiques, la liste des agents pathogènes à suivre ne comprend pas *C. perfringens*. Cette même norme qui apporte des informations utiles aux producteurs pour évaluer l'efficacité d'hygiénisation des procédés de compostage, s'intéresse aux valeurs de référence d'*Escherichia coli* et d'entérocoques mais n'a pas déterminé ce que pourrait être cette valeur de référence pour *C. perfringens* (cf Annexe B de la norme). La Réglementation Boue (Arrêté du 8 janvier 1998), quant à elle ne prend pas en compte la présence de *C. perfringens*.

L'objet de l'avis est de définir une approche commune quant aux teneurs attendues en *C. perfringens* pour contrôler la qualité bactériologique des matières fertilisantes et des supports de culture à base de matières organiques, dont ceux constitués de boues ou d'effluents d'élevage. La démarche consiste à allier l'exigence sanitaire pour ces produits vis-à-vis des utilisateurs et de leur environnement, et la nécessaire faisabilité technique des analyses en routine pour détecter la présence de *C. perfringens*.

L'avis s'attache donc à décrire de manière non exhaustive les caractéristiques biologiques et pathogènes de *C. perfringens*. Il s'intéresse ensuite à placer la question de l'exposition à cet agent pathogène dans le contexte des matières fertilisantes et des supports de culture. Enfin, il s'agit d'apprécier le rôle que peut jouer *C. perfringens*, avec d'autres microorganismes, comme indicateur de la qualité microbiologique des matières fertilisantes et des supports de culture.

2. Caractéristiques biologiques de *Clostridium perfringens*

Les *Clostridium perfringens* sont des bactéries ubiquistes, anaérobies aérotolérantes, sporulantes. On considère généralement que les principaux réservoirs sont le sol et le

² NF U44-095 : norme sur les amendements organiques : Composts contenant des matières d'intérêt agronomique, issues du traitement des eaux

³ ufc : unité formant colonie

tractus intestinal des hommes (y compris sains) et des animaux (volailles, bovins, porcs, poissons).

2.1. Caractéristiques des formes végétatives

La croissance des formes végétatives intervient entre 10 et 50°C, avec un optimum autour de 40-45°C (Afssa, 2006). L'activité de l'eau^{4,5} (a_w) minimale pour la croissance est de 0,97 (Afssa, 2006) ou selon les sources, de 0,94 à 0,95 (EFSA, 2005). Le pH optimum se situe entre 7 et 7,5 et les pH extrêmes sont de 5 et 8 (Afssa, 2006). Dans les conditions optimales, le temps de doublement est de 7 minutes (Afssa, 2006). Les formes végétatives sont détruites à partir de 65°C dans des milieux de culture classiques. Byrne *et al.* (2006) ont obtenu des temps de réduction décimale (abaissement par un facteur 10 de la population bactérienne) de 16,3, 8,5 et 0,8 minutes à des températures de 55, 60 et 65°C, respectivement sur des formes végétatives inoculées dans de la viande. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles rapportées par Juneja et Marmer (1998). Canada *et al.* (1964) ont observé un taux de survie des formes végétatives très faible pour des températures supérieures ou égales à 80°C (Tableau 1).

Tableau 1 : Taux de survie des formes végétatives de *Clostridium perfringens* dans 2 solutions différentes et à 3 couples temps/température différents (Canada *et al.*, 1964)

Température (°C) et durée d'exposition	Quantité initiale (cellules/mL)	Tampon Phosphate (pH 7,2)	Peptone (0,1%)
7,1°C (48 heures)	10 ³	0,6%	4%
	10 ⁶	0,3%	9,6%
80°C (10 min)	10 ³	3,8%	0%
	10 ⁶	0%	0%
100°C (10 min)	10 ³	0%	0,2 %
	10 ⁶	0,1 %	0%

L'humidité du substrat a un effet potentialisant de la chaleur, ce qui signifie qu'à température équivalente, l'efficacité du traitement thermique pour l'inactivation des bactéries augmente lorsque l'humidité de la matrice augmente⁶. Les acides organiques ont également un effet potentialisant de la chaleur.

En résumé, selon les études le paramètre suivi correspond soit à un taux de réduction décimal, soit à un taux de survie mais il ressort qu'à partir de 65°C, l'effet de la température sur les formes végétatives est marqué.

Il serait utile d'établir des abaques sur différentes matrices de MFSC pour préciser le lien entre la température et le temps de traitement thermique, et l'efficacité des traitements pour l'abattement des formes végétatives et des spores de *C. perfringens*, ceci en chaleur humide ou en chaleur sèche.

⁴ L'activité de l'eau exprime la disponibilité de l'eau, c'est-à-dire l'eau non liée à la matrice.

⁵ Il n'existe pas de correspondance directe entre l'activité de l'eau et la teneur en matière sèche d'un substrat pour les MFSC.

⁶ Source : Olivier Cerf, ENV Alfort

2.2. Caractéristiques des spores

Les spores ont une résistance élevée. Leur thermorésistance dépend du milieu (voir Tableaux 2 et 3) et des souches. Le Tableau 2 montre que le temps de réduction décimale peut varier entre 0,015 et 30 minutes environ lorsque la température est comprise entre 90 et 100°C. En pratique, on constate un temps de réduction décimale compris entre 1 et 60 minutes pour des températures de 90 à 100 °C (Afssa, 2006). Les spores montrent une certaine thermorésistance à 80°C (Tableau 3).

Tableau 2 : Résistance thermique des spores de *Clostridium perfringens* (ICMSF, 1996)

Matrice	Température	Temps de réduction décimale (min)
Tampon Phosphate , pH 7.0	90 à 100°C	0,015 à 18,6
Tampon Phosphate , pH 7.0	100 à 110°C	1,29 à 3,15
Jus de viande, pH 7.0	90 à 100°C	31,4
Jus de viande, pH 7.0	100 à 110°C	0,5 à 6,6

Tableau 3 : Taux de survie des spores de *Clostridium perfringens* dans 2 solutions différentes et à 3 couples temps/température différents (Canada *et al.*, 1964)

Température (°C) et durée d'exposition	Quantité initiale (cellules/mL)	Tampon Phosphate (pH 7,2)	Peptone (0,1%)
7,1°C (pendant 48 heures)	10 ³	31,8%	26%
	10 ⁶	34,5%	25,9%
80°C (pendant 10 min)	10 ³	5,8%	15,8%
	10 ⁶	4,8%	8%
100°C (pendant 10 min)	10 ³	0%	1,1%
	10 ⁶	0%	0%

Dans le Tableau 3, l'écart du taux de survie de 26% (température de traitement de 7,1°C) et 16% (température à 80°C) n'est pas significatif. Seule une température de 100°C permet un abattement significatif des spores. Plus récemment, Byrne *et al.* (2006) ont observé des temps de réduction décimale des spores de *C. perfringens* inoculées dans de la viande de 30,6, 9,7 et 1,9 minutes à des températures respectivement de 90, 95 et 100°C. Cela confirme la résistance des spores aux températures supérieures à 80°C.

Des données ont été établies dans des matrices alimentaires et des milieux de culture mais les constantes sont difficilement transposables d'un aliment à un autre⁷. Il conviendrait donc de vérifier ces données sur des matrices de type MFSC.

De plus, les faibles activités de l'eau (a_w)^{3,4} et les pH neutres accroissent la thermorésistance des spores, tandis que les pH faibles (pH inférieurs à 4,5) augmentent la sensibilité à la chaleur (EFSA, 2005). Un pH acide empêche la sporulation des formes végétatives. L'entérotoxine, libérée lors de la sporulation, thermolabile, est dénaturée à partir de 55°C. Cette protéine est également sensible à l'acidité et aux enzymes protéolytiques.

⁷ Source : Martine Poumeyrol, Afssa - LERQAP

Les spores sont activées par un choc thermique, de manière variable selon les souches. Le chauffage à 75°C (+/- 5 °C) pendant 15 minutes est ainsi normalisé pour la recherche des *Clostridium* anaérobies sulfito-réducteurs dans les eaux destinées à la consommation humaine (NF EN ISO 26461-2, AFNOR, 1993). Les spores germées se multiplient très vite si le milieu est partiellement anaérobie et le refroidissement lent.

Dans une étude menée sur des refus de centrifugation de lisier de porc (à savoir la partie solide du lisier), Pourcher *et al.* (2008) ont montré que les températures de 55°C et 60°C, même maintenues pendant 3 jours n'étaient pas suffisantes pour diminuer significativement le nombre de spores de *C. perfringens* (Tableau 4). Seule la température de 70°C maintenue pendant 72 heures a permis une élimination des spores.

Tableau 4 : Effet du couple temps/température sur les spores de *C. perfringens* dans des refus de centrifugation de lisier de porc. (Pourcher *et al.*, 2008).

Température	Durée (heures)	Concentration en spores (ufc/g)
20°C	T0 ^a	7,9 10 ⁴
55°C	6h	3,7 10 ⁴
	24h	5,4 10 ⁴
	72h	2,3 10 ⁴
60°C	6h	7,9 10 ⁴
	24h	2,0 10 ⁴
	72h	6,8 10 ³
70°C	6h	2,9 10 ³
	24h	20
	72h	<1

^a début de l'expérimentation

En conclusion, la destruction des spores de *Clostridium perfringens* nécessite une température supérieure à 70°C/80°C selon les expériences et les milieux. A titre de comparaison, un compostage de 3 jours à 70°C contribue à la destruction des spores.

3. Pathogénicité de *Clostridium perfringens*

Les *C. perfringens* sont des bactéries de classe 2 selon la classification de la Directive 2000/54/CE⁸, ce qui signifie qu'elles peuvent « provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; [leur] propagation dans la collectivité est improbable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace ». Elles produisent diverses nécrotamines, qui sont d'ailleurs considérées par la réglementation européenne comme des « biens à double usage », c'est-à-dire pouvant être utilisées à des fins militaires (Règlement CE/1334/2000 modifié). Enfin un récent arrêté (Arrêté du 30 juin 2010 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique) a inscrit les types B et D (producteurs de toxine epsilon) dans la liste des micro-organismes et toxines dont l'emploi serait de nature à présenter un risque pour la santé publique ainsi que les produits qui en contiennent. On considère habituellement 5 toxinotypes (A, B, C, D, E), quoique le typage génétique révèle une plus grande diversité des souches. Environ 6 à 8% des souches possèdent le gène de l'entérotoxine.

⁸ Directive 2000/54/CE du Parlement et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail

3.1. Caractère pathogène pour l'homme

Chez l'homme, *C. perfringens* est responsable de pathologies graves, voire létales, en cas de contamination d'une plaie profonde (gangrène gazeuse, hémolyses, troubles cardiaques) et de septicémies dans des cas de complications de plusieurs pathologies, notamment de cancer intestinal. Plus rarement, la consommation d'aliments contaminés peut conduire à des entérites nécrosantes (en particulier chez des personnes âgées). Les intoxications alimentaires graves dues à *C. perfringens* (type A) peuvent parfois être fatales pour des personnes âgées ou de jeunes enfants (Afssa, 2006). Selon la documentation disponible, il n'existe pas de transmission directe entre l'animal et l'homme. Les toxi-infections alimentaires (TIA) liées à cette bactérie (diarrhées violentes et douloureuses non fébriles sans vomissements) sont causées par l'entérotoxine produite lors de la sporulation dans l'intestin grêle (Afssa, 2006) : le passage du pH acide de l'estomac au pH neutre de l'intestin grêle déclenche la sporulation et la libération de l'entérotoxine qui est à l'origine de la diarrhée. Néanmoins dans certains cas un développement des *C. perfringens* est possible dans l'estomac avant l'imprégnation par les sucs gastriques ou dans l'intestin lors d'un dysfonctionnement du foie, la bile ne jouant plus son rôle désinfectant⁹.

Les TIA à *C. perfringens* sont généralement d'évolution favorable et spontanée en 24 à 72 heures. Le déclenchement de la TIA apparaît en cas d'ingestion d'une quantité importante de bactéries (10^6 à 10^8 ufc par portion (EFSA, 2005)), ce qui correspond environ à une teneur supérieure à 10^5 ufc par gramme d'aliment (Afssa, 2006) notamment, parce que les bactéries sont en partie détruites lors du passage dans l'estomac. Par ailleurs, une étude de l'Afssa de 2006 indique une Dose Minimale Infectante (DMI) pour *C. perfringens* de l'ordre de 10^6 germes, *per os* (par voie orale).

En France, sur la période 1990 à 2003, pour les foyers de TIAC¹⁰ confirmées, 36% étaient dus à des *Salmonella enterica*, 27% à *Staphylococcus aureus* et 17% à *C. perfringens*. Parmi les foyers familiaux confirmés, 72% étaient dus à des *Salmonella enterica*, 12% à *Staphylococcus aureus* et 3% à *C. perfringens* (Delagoutte, 2008). *C. perfringens* fait partie des 4 principales bactéries responsables de TIA (Afssa, 2006, InVS, 2003). *C. perfringens* a été mis en cause dans 3000 à 9000 cas de TIAC recensées par an en France dans les années 90, contre 300 à 800 cas déclarés par an au début des années 2000, auxquels s'ajoutent les cas sporadiques non déclarés ou non identifiés (probablement nombreux car les symptômes étant relativement bénins tous les cas ne sont pas déclarés).

En résumé, la littérature ne mentionne pas de cas de contamination chez l'homme liés à *C. perfringens* autres que par intoxication alimentaire ou contamination de plaies profondes.

3.2. Caractère pathogène pour l'animal

C. perfringens est une cause importante d'entérites et entérotoxémies chez les ruminants, chevaux, porcs et volailles. Les principaux toxinotypes incriminés sont les B, C et surtout le D chez les bovins, le C et le D chez l'agneau, le C et parfois le A chez le porc (entérite nécrotique), le A et parfois le C chez le poulet (entérite nécrotique). Le développement de la maladie est souvent associé à la présence du gène *cpb2* de la toxine β_2 chez les souches isolées chez le porc, les bovins et le cheval (Schotte *et al.*, 2004). La toxine NetB, produite par certaines souches virulentes de type A, est également incriminée dans l'entérite nécrotique chez le poulet (Keyburn *et al.*, 2008).

⁹ Source : Alain Cudennec (CES MFSC, Février 2009)

¹⁰ TIAC = Toxi-Infection Alimentaire Collective

Toutefois, ces pathologies semblent en général liées non pas à une absorption excessive du pathogène, mais à des problèmes alimentaires ou des stress conduisant à des déséquilibres de la microflore naturellement présente dans le tractus intestinal, comme le soulignent, par exemple chez les ruminants, les études réalisées sur des bovins charolais (Philippeau *et al.*, 2004) ou sur le veau Blanc Bleu Belge (Manteca Villanueva, 2004). Ces déséquilibres permettent la prolifération des souches de *Clostridium* présentes dans l'intestin, et la libération concomitante des toxines par les souches virulentes.

Comme chez l'homme, le portage est néanmoins systématique chez les bovins, ovins, caprins, porcins, équins, oiseaux, lagomorphes, poissons, mollusques, crustacés et tuniciens, avec des teneurs dans le contenu digestif de l'ordre de 10 à 1.10^3 ufc par gramme (Afssa, 2006, Mustin *et al.*, 2008).

4. Appréciation du potentiel contaminant de *Clostridium perfringens*

Cette analyse se limite au risque lié à l'exposition orale. L'incidence de la présence de ces bactéries dans une MFSC sur le risque d'intoxication alimentaire n'a pas été étudiée spécifiquement dans la littérature consultée. Il est néanmoins possible de prendre en considération les éléments ci-après.

4.1. Prévalence dans les MFSC

4.1.1. Produits homologués en France

La base de données du Ministère en charge de l'Agriculture, relative aux produits homologués contenant des matières organiques montre que sur 74 produits dont les données analytiques sont exploitables, près de la moitié (46%) sont indemnes, avec certitude, de *Clostridium perfringens* (formes végétatives et spores), une quinzaine font état d'une teneur inférieure à 10 ufc par gramme et deux seulement présentent des teneurs supérieures à 1000 ufc par gramme. Cependant, le Guide pour la Constitution des Dossiers de Demande d'Homologation du Ministère en charge de l'Agriculture (Cerfa n°50644) propose comme valeur de référence l'absence de spores et de formes végétatives. La plupart des études ayant été réalisées sur des produits à base de boues et d'effluents d'élevage, les paragraphes suivants se sont concentrés sur cette catégorie de matières fertilisantes. En effet, ces matières organiques, du fait de leur origine, sont systématiquement contaminées par *C. perfringens*.

4.1.2. Boues de stations d'épuration

La teneur en bactéries anaérobies sulfito-réductrices (dont les *C. perfringens* sont une sous-population importante) est relativement stable dans les boues d'épuration, pour un procédé de traitement donné (Elissalde *et al.*, 1994). Elissalde *et al.* (1994) rapportent des teneurs en clostridies sulfito-réductrices comprises entre 7 unités et 9 unités \log_{10} par litre pour des boues primaires, entre 8 et 10 unités \log_{10} par litre pour des boues de première lagune et entre 7 unités et 8 unités \log_{10} par litre pour des boues de quatrième lagune. Les procédés de stabilisation des boues par chaulage ou compostage réduisent significativement leur charge en pathogènes (Barbe *et al.*, 2001). Une étude récente conduite sur des boues d'épuration a ainsi montré qu'une boue d'épuration contenant initialement 1.10^5 à 4.10^5 ufc de formes végétatives de *C. perfringens* par g (méthode V 08-056¹¹ modifiée, adaptée pour le programme 108, relatif aux analyses des matières fertilisantes et supports de culture) présentait, après compostage, des teneurs de l'ordre de 10 à 7.10^2 ufc par gramme (Wéry *et al.*, 2008).

¹¹ Méthode utilisée dans le cadre du programme 108

Certains traitements comme la digestion mésophile ne sont que peu efficaces sur les spores. Mocé-Llivina *et al.* (2003) rapportent une concentration en spores de clostridies sulfito-réducteurs comprises entre 5,5 unités log₁₀ pour 100 mL et 7,2 unités log₁₀ pour 100 mL dans une boue brute. La digestion (25 jours) et la déshydratation (centrifugation de cette même boue) aboutissent à des concentrations comprises entre 4,9 et 6,8 unités log₁₀ pour 100 mL.

4.1.3. Effluents d'élevage

Des mesures menées sur lisier de porc non traité indiquent des concentrations en *C. perfringens* de l'ordre de 1.10³ à 1.10⁴ ufc par mL¹² (Juteau *et al.*, 2004). Par comparaison, les concentrations en *coliformes fécaux* analysés dans les mêmes échantillons sont du même ordre de grandeur. Par contre, les concentrations en *Campylobacter spp* sont inférieures d'un log₁₀. D'autres travaux donnent des teneurs en *C. perfringens* dans les effluents d'élevage allant d'environ 10² clostridies par mL à 7.10⁴ spores par gramme pour un lisier de porc (Elissalde *et al.*, 1994, Dabert *et al.*, 2009) et à 5.10³ par millilitre pour un fumier d'ovin (Lorthios, 1998).

Une étude portant sur des bovins de race Blanc bleu belge (Manteca Villanueva, 2004), indique que la majorité des animaux victimes d'entérototoxicité présente une forte augmentation des teneurs en *C. perfringens* dans leur contenu intestinal (multiplication par un facteur 10² à 10⁴).

Des essais d'hygiénisation du lisier de porc montrent qu'après un traitement de 6 jours à une température maximale comprise entre 60°C et 75°C, *C. perfringens* passe d'une concentration initiale de 10³ à 10⁴ ufc par mL, à une concentration finale de 1 ufc par mL voire inférieure (Juteau *et al.*, 2004). La teneur en *C. perfringens* a été mesurée par comptage sur milieu solide. En revanche, un traitement de la même durée au cours duquel la température maximale est de 50°C, montre un abattement plus faible de la bactérie (la concentration finale de *C. perfringens* dans l'effluent traité est de 15 ufc par mL).

Une analyse *post-mortem* de cadavres de charolais morts suite à une entérototoxicité, montre que la teneur en *C. perfringens* dans l'intestin grêle passe d'une valeur inférieure à 10⁵ ufc par mL à une valeur supérieure à 10⁸ ufc par mL dans les 15 heures qui suivent la mort de l'animal, soit un facteur d'enrichissement de 10⁴ environ (Philippeau *et al.*, 2004). Il est à noter que le lieu précis de prélèvement de l'échantillon dans le tractus intestinal peut influencer le résultat des mesures¹³.

4.2. Contamination des denrées végétales et des eaux via les MFSC

La capacité de survie des spores de *C. perfringens* sur les végétaux et dans le sol est supérieure à celle des streptocoques, des staphylocoques et des Entérovirus, et comparable à celle des *Listeria* ou des œufs d'Helminthes (Elissalde *et al.*, 1994). Les spores constituent en effet une forme de résistance bactérienne très efficace (les spores sont 10 à 50 fois plus résistantes aux UV que les formes végétatives). La température d'élimination des spores de *C. perfringens* est de 30 à 40°C supérieure à la température d'élimination de ses formes végétatives. A cela s'ajoute le fait que les spores de *C. perfringens* apparaissent parmi les indicateurs bactériens les plus résistants (Bustamante *et al.*, 2008, Pourcher *et al.*, 2008).

Aucune donnée spécifique au risque de contamination des eaux souterraines ou de surface par les *C. perfringens* suite à des pratiques de fertilisation n'est disponible. Des cas de contaminations sont en revanche connus pour d'autres microorganismes. Ainsi, des travaux ont montré l'existence d'un transfert des bactéries entériques par

¹² On peut considérer que 1 ml de lisier est égal à 1g

¹³ Source : Alain Cudennec, CES-MFSC (Février 2009)

ruissellement après des épandages des effluents d'élevage (Meals et Braun, 2006, Muirhead *et al.*, 2006, Pachepsky *et al.*, 2006, Gubert *et al.*, 2007, Williams *et al.*, 2008). Les eaux de surface peuvent être concernées sous l'effet du ruissellement, si les sols sont engorgés, les pluviométries importantes, les zones d'épandage en pente, les sols nus, etc. Il est légitime de se demander si les bonnes pratiques agricoles définies par l'arrêté du 22 novembre 1993 dans le cadre de la protection des eaux contre la pollution par les nitrates permettent une gestion de la contamination des eaux de surface par les micro-organismes. Il conviendrait de s'interroger si les mesures imposées par la directive nitrates sont de nature à limiter les risques de contamination par *C. perfringens* des eaux de surface. Les données disponibles sur le sujet sont insuffisantes.

Les données générales de la littérature indiquent que les microorganismes apportés à un sol transitent très peu vers les eaux souterraines, sauf dans quelques conditions très particulières (pluviométries élevées, structure du sol très altérée, proximité de la nappe, milieux karstiques).

4.3 Contamination des animaux

La cellule de veille sanitaire vétérinaire des épandages des boues résiduelles, n'a pu mettre en évidence, depuis 1997, aucune corrélation univoque entre des épandages réglementaires de boues et des événements pathologiques pour l'animal¹⁴. A ce jour, aucune implication des MFSC, n'a été mise en évidence dans des entérotoxémies liées à *C. perfringens*.

Par ailleurs, il n'y a pas de donnée publiée démontrant un lien entre l'apport de fertilisants contenant des *C. perfringens* et la contamination de denrées alimentaires d'origine animale.

4.4. Contamination de l'homme par l'alimentation

Du fait du caractère ubiquiste de la bactérie, la plupart des denrées alimentaires peuvent contenir des *C. perfringens*, provenant de contaminations *via* le sol ou par des matières fécales (EFSA, 2005). La cuisson des aliments détruit en général les formes végétatives, mais pas ou peu les spores. Par ailleurs, la cuisson provoquant un choc thermique favorise l'anaérobiose : ces deux facteurs favorisent la germination des spores de la bactérie. Toutefois, les cas répertoriés d'intoxication alimentaire dus à *C. perfringens* sont en général attribués à des conditions défavorables de préparation et de conservation des plats (viandes ou haricots en sauce en grande quantité, refroidis trop lentement, ou réchauffés...) et non à des problèmes de contamination initiale importante des denrées. De ce fait, l'EFSA souligne que la détection en routine des *C. perfringens* dans les aliments présente peu d'intérêt pour la prévention des risques de toxi-infection alimentaire, sauf à détecter ainsi des cas de très forte contamination (EFSA, 2005). Ce critère n'a d'ailleurs pas non plus été retenu dans le Règlement (CE) n°2073/2005 portant sur l'harmonisation des critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

De manière générale, les données disponibles permettent de considérer que l'ingestion de végétaux, notamment cuits, représente une cause mineure de transmission de maladies bactériennes (Afssa, 2003 ; Elissalde *et al.*, 1994 ; INERIS *et al.*, 2007). Dans les cas identifiés, relatifs à d'autres pathogènes que les *Clostridium*, l'utilisation de fertilisants organiques a pu parfois être mise en cause (Afssa, 2003). Les végétaux consommés crus pourraient être une source plus probable de contamination par voie alimentaire (Elissalde *et al.*, 1994). Ceci a notamment conduit le Ministère en charge de l'Environnement à introduire des restrictions d'usage de boues d'épuration sur les cultures légumières, par

¹⁴ Source : Isabelle Déportes, ADEME

principe de précaution (Arrêté Ministériel du 8 janvier 1998, art.13). Aucun cas de contamination liée à des *C. perfringens* contenus dans des fertilisants n'a été décrit à ce jour. En revanche, dans une synthèse sur la survie des pathogènes présents dans les déjections animales et leur transmission à l'homme, Guan et Holley (2003) ont rapporté des foyers de contamination qui pourraient être associés à d'autres microorganismes tels que *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter spp* et *Cryptosporidium spp*. Cependant le caractère ubiquiste de la bactérie rend probablement très difficile l'identification d'une telle filiation, si elle est possible. Sans mettre spécialement en cause les fertilisants, l'origine environnementale des contaminations secondaires des aliments par les *C. perfringens* est soulignée¹⁵.

Les aliments responsables de TIA (toxi-infections alimentaires) contiennent au minimum 10⁵ formes végétatives vivantes par gramme. Par ailleurs, une étude de l'Afssa de 2006 indique une Dose Minimale Infectante (DMI) pour *C. perfringens* de l'ordre de 10⁶ germes (Afssa, 2003).

4.5. Bilan

Si la pathogénicité de *Clostridium perfringens* est reconnue, il n'a pas été rapporté dans la littérature consultée de cas mettant en cause des matières fertilisantes ou des déjections animales émises au champ, au contraire d'autres pathogènes (Dorioz *et al.*, 2006). Un tel lien serait de toute façon très difficile à établir étant donné la complexité des causes d'entérotoxémies et l'ubiquité de *C. perfringens*.

Les concentrations habituellement rencontrées dans des déjections animales (10² à 10⁴ bactéries par gramme) représentent donc un risque faible de contamination par voie orale de l'homme ou de l'animal, dans les usages pris en compte dans le présent document. Toutefois, les éléments disponibles ne permettent pas de fixer une concentration limite dans les MFSC au regard du risque toxique de *C. perfringens*. En effet, à notre connaissance, il n'a pas été entrepris d'évaluation des risques spécifiques à la présence de *C. perfringens* et de ses toxines dans les MFSC. Des travaux pourraient être menés pour éclaircir les différents points tels que les teneurs de *C. perfringens* dans le sol, les conditions de sol et de fertilisation susceptibles de favoriser sa prolifération et la production de ses toxines, le délai de transfert des bactéries du sol vers les plantes et les voies de transfert possibles. Ces études pourraient être aussi ciblées sur les toxinotypes les plus pertinents (par exemple type A pour le risque chez l'homme).

5. Utilisation de *Clostridium perfringens* pour évaluer le danger microbien représenté par les MFSC d'origine organique

Les MFSC, et plus particulièrement celles contenant des produits issus du traitement des eaux résiduaires, peuvent contenir de nombreux micro-organismes pathogènes.

D'une manière générale, les germes pathogènes les plus préoccupants du fait de leur fréquence dans le milieu hydrique, dans les matières issues du traitement des eaux ou dans les matières d'origine animale (notamment carnées ou fécales, Foliguet *et al.*, 1966) en général, peuvent se classer en 7 catégories, les catégories 1 à 6 regroupant des pathogènes reconnus :

- 1) **Virus** (ex : virus de l'Hépatite A, le virus de *Norwalk et Norovirus*, *Enterovirus*, *Polyovirus*, *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Reovirus*, *Astrovirus*, *Calicivirus*, *Echovirus*, *Smail round virus*, *Parvovirus*, *Influenza*, accessoirement, le virus de la peste porcine, virus de la fièvre aphteuse)

¹⁵ Source : Nathalie Jourdan, InVS

- 2) **Protozoaires** (ex : oocystes ou kystes de *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii*, *sarcocystis*)
- 3) **Œufs d'helminthes** (ex : œufs d'*Ascaris*, *Toxocara*, *Trichuris*, *Taenia*)
- 4) **Levures et moisissures** (ex : spores d'*Aspergillus*)
- 5) **Bactéries non sporulées** (ex : *Salmonella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Shigella*, *Vibrio*)
- 6) **Bactéries sporulées pathogènes aérobie** (ex : *Bacillus anthracis*), ou **anaérobies** (ex : *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium hemolyticum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium botulinum*)
- 7) **Bactéries sporulées aéro-anaérobies ou anaérobies banales** (ex : clostridiales protéolytiques dont par exemple *Clostridium sporogenes*, envahissant), dont la pathogénicité n'est pas démontrée.

Compte tenu de la grande diversité des agents pathogènes susceptibles d'être présents dans les matières fertilisantes à base de matières premières organiques, il n'est pas possible pour des raisons techniques et économiques de réaliser une analyse exhaustive et systématique de chaque lot de production. Il s'avère donc pertinent d'appuyer l'analyse de la qualité microbienne d'un produit constitué de matières animales ou fécales sur des microorganismes témoins, des indicateurs, à qui est attribué un rôle de représentativité d'une flore microbienne variée.

Toutefois dans un objectif d'évaluation de risque, ces indicateurs ne peuvent se substituer aux microorganismes pathogènes eux-mêmes.

5.1. Notion d'indicateurs

Dans le contexte de cette saisine, on considère que les microorganismes indicateurs sont présents dans la flore intestinale des hommes et des animaux ou dans les produits carnés. Leur présence dans un milieu témoigne d'une contamination fécale. A cet égard, ils ont été historiquement utilisés dans la surveillance des milieux et plus particulièrement de la qualité des eaux (eaux de boissons, eaux de baignade).

Dans le cadre des MFSC ne contenant pas de matières fécales ou carnées, la présence de microorganismes d'origine fécale, indique une contamination lors de la fabrication du produit. Dans ce cadre-là, l'indicateur choisi doit être strictement lié à ces matières.

Concernant les matières fertilisantes organiques d'origine fécale ou carnée, un indicateur de contamination fécale est redondant. Par contre, certains microorganismes présents dans les fèces peuvent être utilisés comme indicateur d'efficacité de traitement. Pour cet usage un bon indicateur de traitement doit présenter plusieurs caractéristiques :

- il est toujours présent dans la matière première ;
- il est présent à des taux suffisamment élevés pour que son abattement lors des traitements soit significatif et mesurable ;
- il a un comportement semblable à celui des microorganismes pathogènes potentiellement présents dans les matières premières : son absence en fin de traitement (ou un fort taux d'abattement) reflète que les pathogènes, s'ils étaient présents au départ, sont également éliminés ;
- on dispose de méthode de routine pour son analyse.

Les critères d'éligibilité d'un microorganisme indicateur sont nombreux. Un indicateur universel unique n'existe pas et seule la combinaison de plusieurs microorganismes est envisageable. L'évaluation d'un système de traitement ou du statut hygiénisé d'un produit ne peut se faire qu'à la lecture d'analyses portant sur plusieurs indicateurs. En effet, la multiplicité des indicateurs est le reflet de la multiplicité des pathogènes. On considère que

Clostridium perfringens, de par ses capacités à sporuler est, en l'état des connaissances plutôt représentatif du comportement des pathogènes présentant des formes de résistances (kyste par exemple).

Classiquement, on retrouve, dans la littérature ou différentes réglementations, les indicateurs parmi 3 groupes ou microorganismes suivants :

- 1 : Coliformes fécaux ou Coliformes thermotolérants, *Escherichia coli* ;
- 2 : Streptocoques fécaux ou entérocoques ;
- 3 : Anaérobies sulfite-réducteurs, *Clostridium perfringens*.

Dans les paragraphes ci-dessous, le rôle de *Clostridium perfringens* comme indicateur est discuté dans la limite de son indispensable complémentarité avec d'autres indicateurs.

5.1.1. *C. perfringens* comme indicateur de traitement

Un indicateur de traitement a pour fonction de démontrer l'efficacité d'un traitement d'hygiénisation, par le fait que le microorganisme choisi comme indicateur est sensible au type de traitement utilisé. La diminution de la teneur de l'indicateur dans le produit, voire sa disparition, est le résultat de l'action du traitement. L'abattement des germes est considéré comme significatif au regard d'une hygiénisation, à partir de 5 log₁₀, en cohérence avec les observations de l'ADEME et du Règlement (CE) n°1069/2009 (Annexe 6 du Règlement).

Un traitement par élévation de la température, compostage ou chaulage (pH supérieur à 11) peuvent conduire à l'hygiénisation du produit. Le compostage comprenant une phase de maturation nécessite, selon une étude bibliographique examinée dans le cadre de la saisine relative à l'identification des dangers et des risques biologiques des matières premières animales utilisées en compostage¹⁶, qu'à 60°C, la durée de la phase thermophile soit de 7 jours, voire de 10 jours pour détruire certaines formes de résistance comme les œufs d'*Ascaris* (pour un compostage par retournement). Lors du compostage, deux critères sont essentiels : le couple temps/température et l'effet biologique lors de la phase de maturation résultant de la disparition du substrat et de la compétition avec d'autres microorganismes comme les actinomycètes. Le traitement des boues au lait de chaux n'a pas d'effet hygiénisant thermique mais il est reconnu pour son effet pH sur un grand nombre de pathogènes, et notamment les virus. La dose d'apport de lait de chaux et la maîtrise du procédé de mélange sont des points importants de contrôle de l'efficacité du traitement (questionnement abordé dans le cadre de la saisine 2009-SA-0066).

En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'affirmer que la résistance des spores de *C. perfringens* à la chaleur, au chaulage et aux désinfectants divers, est réellement comparable à celle des pathogènes reconnus pour être les plus résistants, à l'exemple des kystes ou oocystes de protozoaires. Il serait à ce titre très utile de réaliser une étude comparative de résistance des différents pathogènes présents dans les MFSC. Néanmoins l'atout principal de *C. perfringens* en tant qu'indicateur de la présence d'autres micro-organismes pathogènes est la grande résistance de ses spores aux températures élevées.

Rimhanen-Finne *et al.* (2004) ont comparé la présence des kystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium* aux dénombrements de *C. perfringens*, *E. coli* et des entérocoques dans les boues de stations d'épuration ayant subi différents types de traitements hygiénisants dont la digestion anaérobie associée au compostage, le compostage et le chaulage. Ils n'ont observé aucune corrélation entre les dénombrements des bactéries indicatrices et la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* ou de kystes *Giardia*. Abu-Orf *et al.* (2004) ont comparé l'effet hygiénisant de la chaux et de cendres volantes sur quatre types de micro-

¹⁶ Saisine n° 2008-SA-0051

organismes présents naturellement (coliformes fécaux, spores de *C. perfringens*) ou inoculés (*Ascaris suum*, réovirus) dans des boues de stations d'épuration stockées plusieurs mois dans un sol. Les coliformes et les réovirus sont apparus moins résistants que les spores de *C. perfringens* et les œufs d'*Ascaris suum* aux différents types de traitements appliqués aux boues. A titre d'exemple, l'addition de chaux à une concentration de 50 g par kg et de cendres à une concentration de 500 g par kg de boues (en poids sec) a entraîné une élimination des coliformes fécaux et des réovirus en 12 jours alors que les spores de *C. perfringens* et les œufs d'*Ascaris* n'ont été éliminés qu'après 356 jours et 365 jours de stockage, respectivement. Toutefois, une réduction de 5 log₁₀ des spores de *C. perfringens* a été observée en 69 jours.

Actuellement, le Règlement Européen sur les sous-produits animaux considère que l'absence de spores de bactéries pathogènes thermorésistantes (dans les sous-produits animaux transformés issus de matières de catégorie 2 destinées aux usines de compostage et de biogaz) est déterminée par l'absence de *C. perfringens* (spores et formes végétatives) dans 1 gramme (Annexe 6 du Règlement (CE) n°1069/2009, modifiée par le Règlement (CE) n°208/2006).

Pour apprécier l'effet du couple temps/température d'un traitement thermique, on peut considérer les températures de laboratoire suivantes^{17,18} :

- 1^{er} palier (température comprise entre 55-60°C) : destruction des pathogènes dont la résistance est équivalente à celle d'*E. coli* ; le critère « dénombrement d'*E. coli* inférieur au seuil de quantification » permet d'admettre que des températures de 55-60°C ont été atteintes.
- 2^{ème} palier (température supérieure ou égale à 65-70°C) : destruction des pathogènes dont la résistance est équivalente aux entérocoques ou aux formes végétatives de *C. perfringens* ; les critères « dénombrements d'entérocoques et de formes végétatives de *C. perfringens* inférieurs au seuil de quantification » permettent d'admettre que des températures de 65-70°C ont été atteintes.
- 3^{ème} palier (température supérieure ou égale à 100°C) : destruction des pathogènes dont la résistance est équivalente aux spores de *C. perfringens*. Le critère « absence de spores de *C. perfringens* dans 1 gramme de MFSC » permet d'admettre que des températures de 100°C ont été atteintes, à condition que le produit ait contenu des spores de *C. perfringens* avant traitement thermique.

En conclusion, *C. perfringens* peut être considéré comme indicateur de traitement d'hygiénisation (notamment de traitement thermique).

5.1.2 *C. perfringens* comme indicateur de contamination d'origine fécale ou carnée

Dans cette section, l'indicateur n'est pas lié obligatoirement à un traitement. Il signale la présence de matière fécale ou carnée pour des matières fertilisantes normalement sans origine fécale ou carnée généralement due à de mauvaises conditions de stockage ou de contaminations croisées lors de la manipulation de lot.

C. perfringens pouvant être présent dans le sol, il n'est pas l'indicateur idéal de matières d'origine fécale. *E. coli* ou les entérocoques sont de ce point de vue, de meilleurs indicateurs de contamination fécale récente.

¹⁷ CES-MFSC (avril 2009)

¹⁸ Il est à noter que le taux d'humidité des matrices et la pression ont une incidence sur l'efficacité du couple temps/température

5.2. Application au contrôle des MFSC

Dans le contrôle des MFSC, *C. perfringens* est utilisé indifféremment comme indicateur de traitement ou de contamination fécale, avec les limites évoquées précédemment. *C. perfringens* n'étant pas un indicateur universel, il est proposé de le considérer dans le cadre des MFSC, selon deux cas de figure.

Cas 1 : le produit est issu d'un traitement hygiénisant

Pour les produits à base de matières premières susceptibles d'être riches en divers organismes pathogènes et ayant subi un traitement hygiénisant deux critères peuvent être évalués : le taux d'abattement (pour la qualification du procédé de fabrication) et le respect de valeurs de référence pour un certain nombre d'indicateurs (pour la qualification du produit).

i) Mesure du taux d'abattement pour la qualification du procédé de fabrication :

L'inoculation de microorganismes exogènes pathogènes n'est pas recommandée pour des raisons de sécurité et de lourdeur de mise en œuvre technique (problème de confinement des germes et des produits inoculés). La mesure d'abattement est réalisée sur des microorganismes endogènes ou sur des microorganismes non pathogènes artificiellement ensemencés.

La mesure d'un abattement de 5 log₁₀ a été rapportée comme significative dans la démonstration de la capacité hygiénisante d'un traitement (Règlement (CE) n°1069/2009 ; WHO¹⁹, 2006). La bibliographie consultée montre que les concentrations en *C. perfringens* dans les matières premières d'origine fécale sont souvent inférieures à 10⁵ germes par gramme. Un ensemencement avec un organisme potentiellement pathogène n'est pas recommandé. De plus, lorsque les concentrations en *C. perfringens* sont insuffisantes, cette bactérie ne peut pas être proposée comme indicateur dans la mesure du taux d'abattement.

Enfin, la mesure d'un abattement, quel que soit le microorganisme indicateur choisi, doit être faite selon un protocole rigoureux (choix des points d'entrée/sortie, nombre de répétitions, enregistrement des paramètres de procédés, etc.). Il pourrait être proposé que cette mise en œuvre ne soit faite que pour la validation de procédés nouveaux ou peu connus ou pour des matières premières présentant un risque spécifiquement identifié.

ii) Respect des valeurs de référence pour la qualification du produit :

Le respect des valeurs de référence pour les indicateurs retenus permet de s'assurer que les pathogènes d'origine fécale et carnée sont également à un niveau acceptable. Ces valeurs doivent refléter l'efficacité de traitement du produit. Elles sont donc inférieures à la concentration rencontrée dans les matières premières. La valeur cible est dépendante de l'usage des MFSC. Elle est plus sévère pour les usages sensibles comme les cultures de fruits ou légumes consommés crus ou cultivés à proximité du sol (ex : fraises).

Dans le dossier d'homologation cette distinction n'existe pas pour le critère *C. perfringens*. Il pourrait être envisagé de conserver un seuil exigeant pour les cultures sensibles (cf. section Analyse, paragraphe 7.2) et de créer une nouvelle valeur de référence pour les autres usages. Les valeurs limites de 10 formes végétatives et spores par gramme de produit pour les légumes et les fraises, et pour prairies et gazons et de 100 formes végétatives et spores par gramme pourraient être proposées pour les autres cultures.

Il est entendu que la conformité générale du produit lors de l'examen du dossier d'homologation ne sera appréciée qu'à la lecture de l'ensemble des indicateurs devant

¹⁹ WHO : World Health Organisation (OMS)

présenter des tendances convergentes et cohérentes au regard des usages, du produit et des revendications du pétitionnaire.

Cas 2 : le produit ne résulte pas d'un traitement hygiénisant

i) Le produit ne contient aucune matière première d'origine fécale ou carnée :

Une étude des dangers et des risques microbiologiques autres que d'origine fécale ou carnée doit être menée selon les principes généraux de la constitution des dossiers de demande d'homologation.

La présence dans le produit des indicateurs nécessaires à l'homologation (entérocoques, *E. coli* et *C. perfringens*), est aberrante et signale un défaut éventuel dans la chaîne de production. Le produit doit alors être dirigé vers le système de traitement des non conformités. Une identification des points critiques doit être menée.

ii) Le produit contient des matières premières d'origine fécale ou carnée :

Dans le cas où tout ou partie des matières premières est d'origine fécale ou carnée, une étude des dangers et des risques doit être menée en plus des analyses réglementaires. Un plan de contrôle spécifique doit être proposé au regard des dangers détectés dans les matières premières.

6. Premières réflexions à propos d'autres microorganismes caractérisant le danger biologique présent dans les MFSC

Le présent avis est une première étape dans la relecture des critères microbiologiques à prendre en compte dans le cadre de l'homologation des MFSC. Seul le critère *C. perfringens* y est envisagé. L'analyse de l'ensemble des critères microbiologiques n'entrait pas dans le cadre des objectifs fixés au groupe de travail. On trouvera cependant ci-dessous des premiers éléments pour de futures discussions sur l'usage d'indicateurs et / ou la recherche de pathogènes.

E. coli est souvent cité. Il est largement ubiquiste, facile à détecter par les laboratoires de routine. Cependant, il ne peut servir d'indicateur de traitement thermique au-delà de 55-60°C et il est, par ailleurs, très sensible aux traitements désinfectants. Son absence ne prouve pas que d'autres pathogènes (ex. : *Cryptosporidium*) ne subsistent pas. Il ne peut donc pas constituer un indicateur unique.

Les entérocoques (anciennement désignés sous le terme de streptocoques fécaux), sont assez ubiquistes et souvent présents en quantités élevées. Ils sont relativement peu sensibles aux désinfectants et certaines espèces, en conditions de laboratoire, résistent pendant 10 mn à des températures allant jusqu'à 65°C. Mettre en évidence leur présence est donc d'une indéniable utilité. Leur résistance n'est cependant pas équivalente à celle des oocystes de *Cryptosporidium* aux kystes de *Giardia*, aux œufs d'Helminthes, aux spores bactériennes ou fongiques. Leurs capacités en tant qu'indicateur sont donc limitées.

Salmonella est un pathogène reconnu. Le CSHPF²⁰ en 1998 préconise sa recherche systématique dans les boues de stations d'épuration car sa présence y est fréquente. Ce germe est aussi fréquent dans les fèces mais pas systématiquement. De nombreux élevages s'efforcent de demeurer exempts de *Salmonella*. En tant que pathogène, sa recherche doit être maintenue, mais *Salmonella* ne peut servir d'indicateur dans la mesure où sa résistance est similaire à celle d'*E. coli*.

²⁰ Conseil supérieur d'hygiène publique de France

Certains auteurs recommandent *Salmonella senftenberg* comme indicateur de procédé en ajout dosé pour sa résistance à la chaleur jusqu'à 65-70°C. Néanmoins, il est difficilement concevable d'utiliser un pathogène dans le procédé de fabrication de MFSC. Ce serait trop dangereux pour le personnel et l'environnement. En outre, les températures d'inactivation de *S. senftenberg* sont inférieures aux températures d'inactivation de nombreux pathogènes potentiellement présents dans les MFSC.

Les œufs d'Helminthes ont été proposés par le CSHPF (1998) pour qualifier les boues de stations d'épuration. Leur résistance dans le milieu extérieur est incontestable et ils sont capables de résister à des températures voisines de 100°C. Assez fréquents dans les boues, ils n'y sont cependant pas dans des proportions très élevées. Leur présence dans les fèces des animaux n'est pas systématique car les élevages sont souvent l'objet de traitements anti-parasitaires. De plus il est difficile d'obtenir des œufs des différents Helminthes pathogènes (*Ascaris*, *Trichuris*, *Taenia*) pour vérifier régulièrement les techniques de recherche en routine. Des divergences de résultats importantes sont apparues entre laboratoires lors d'essais comparatifs. En outre, la viabilité des œufs détectés peut donner matière à controverse dans la mesure où sa caractérisation repose sur des colorations dites vitales, sur l'observation de la structure interne des œufs ou sur la larviculture. Leur utilisation comme indicateur ne semble donc pas opportune.

Les Enterovirus sont les troisièmes pathogènes à rechercher dans les boues (arrêté ministériel du 08 janvier 1998) selon le CSHPF (1998). Ce sont en effet des virus pathogènes fréquents dans les eaux usées et les boues de stations d'épuration. Leur résistance à la chaleur et aux agents inactivant est élevée. Ils font partie des virus entériques qui regroupent, entre autres, les *Enterovirus*, le virus de la poliomyélite, les *Norovirus*, les *Rotavirus*. Bien que difficile et onéreuse, leur recherche sur cultures cellulaires est cependant possible et c'est pourquoi le CSHPF l'a préconisée. Néanmoins, les MFSC contiennent de nombreux éléments toxiques pour les cultures de cellules. De plus, les virus ont tendance à s'adsorber sur les particules présentes dans les MFSC et à s'éliminer au cours des phases de purification en vue de leur analyse. Ces phénomènes nuisent à une récupération efficace des virus présents. Leur recherche en tant qu'indicateurs est ainsi peu envisageable tant du point de vue de l'efficacité de recouvrement que du point de vue économique.

Cryptosporidium parvum* et *Giardia ont été systématiquement recherchés dans les eaux aux USA et au Canada depuis que l'épidémie de Milwaukee a montré que l'absence de *E. coli* dans les eaux ne garantissait pas l'absence d'autres pathogènes, dont *Cryptosporidium* qui possède des oocystes très résistants aux désinfectants chlorés. Leur présence dans les boues de stations d'épuration et les fèces est fréquente, et la résistance de leurs oocystes ou kystes, aux agents chimiques et à la chaleur, est élevée. Des préparations d'oocystes dosés sont disponibles dans le commerce. Cependant, des essais en aveugle entre laboratoires aux USA ont montré une réelle déficience de détection. A cela s'ajoute que la mise en évidence de la viabilité de ces pathogènes repose sur des colorations vitales des oocystes ou kystes détectés, techniques sujettes à critiques, fondées ou non. Très peu de laboratoires pratiquent cette recherche en France du fait qu'elle n'est pas obligatoire. Enfin, le nombre d'oocystes détectés dans les boues de stations d'épuration ou les fèces ne dépasse pas régulièrement 1.10^2 ou 1.10^3 oocystes par gramme de boue. Un abattement de $5 \log_{10}$ serait difficile à mettre en évidence, comme dans le cas de *C. perfringens*. Il ne semble donc pas pertinent de choisir *Cryptosporidium* et *Giardia* comme indicateurs, malgré leur intérêt.

Parmi les **bactéries sporulées non pathogènes** (groupe 7, voir chapitre 4), des germes aéro-anaérobies tels que *Bacillus subtilis* peuvent offrir un intérêt certain. Ces bactéries sporulent facilement et on peut trouver dans le commerce des suspensions de spores de

Bacillus subtilis dosées. Il est donc possible d'utiliser ces suspensions pour vérifier l'efficacité hygiénisante d'un procédé de fabrication. Ces bactéries étant non pathogènes, il n'y a pas de risque d'infecter l'installation ou les manipulateurs. Cependant, les spores de *Bacillus subtilis* et de ferments lactiques sporulés sont nettement plus résistantes à la chaleur que les spores de *C. perfringens* (elles résistent au-delà de 110-115°C et servent à vérifier des autoclavages à 121°C). Elles ne peuvent donc être utilisées que pour des procédés de fabrication utilisant de très hautes températures d'hygiénisation.

La microbiologie fait appel depuis quelques années aux méthodes utilisant des sondes nucléiques pour l'amplification de séquences d'ADN par la technique « Polymerase Chain Reaction » (PCR). L'évolution des techniques permet la quantification par PCR en temps réel, ainsi que la détection sélective de bactéries viables par PCR. Ces méthodes PCR ne sont pas encore adaptées à l'évaluation de l'innocuité microbiologique des MFSC et donc non disponibles en laboratoire de routine.

Cette liste d'indicateurs n'est évidemment pas exhaustive. Néanmoins elle montre que les alternatives possibles aux spores et aux formes végétatives de *C. perfringens* ne sont pas sans critiques ni sans limites. La recherche et le dénombrement des spores et des formes végétatives de *C. perfringens* gardent donc tout leur intérêt, à condition que, suivant les buts poursuivis, les germes recherchés (spores ou formes végétatives) et les méthodes à utiliser soient clairement définis et respectés.

7. Recherche et dénombrement de *Clostridium perfringens* et interprétation des résultats.

7.1. Méthodes d'analyse

Quatre techniques d'analyse des *C. perfringens* sont mises en œuvre pour les MFSC, les deux premières pour une recherche quantitative (dénombrement) et les deux suivantes pour une recherche qualitative (présence/absence) :

- Méthode 1 : dénombrement de *C. perfringens* (résultat rapporté au gramme) ; cette méthode a un seuil de détection de 10 ufc par g (norme NF EN ISO 7937); cette méthode permet essentiellement une caractérisation des formes végétatives ;
- Méthode 2 (adaptation de la Méthode 1) : dénombrement des spores de *C. perfringens* (résultat rapporté au gramme) ; cette méthode est identique à la Méthode 1 avec une étape préliminaire consistant en un chauffage à 80°C à cœur pendant 10 minutes ;
- Méthode 3 : recherche des formes végétatives de *C. perfringens* dans 1 g de produit (LV02-9502 méthode interne LDAR02²¹, dérivée de la Méthode 1 par un passage initial par des conditions d'enrichissement optimales sur un bouillon viande-foie classique, l'utilisation de la méthode de confirmation modifiée, et l'absence de dénombrement final) ;
- Méthode 4 (adaptation de la Méthode 3) : recherche des spores de *C. perfringens* dans 1 g de produit après chauffage à 80°C, éliminant les formes végétatives et excitant les spores pour leur permettre de germer (LV02-9502 précédée d'une étape préliminaire de thermisation qui supprime les formes végétatives présentes initialement et induit la germination des spores, dérivée de la méthode Eaux).

²¹ LDAR02 : Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche de L'Aisne

Ces techniques relativement lentes sont réalisables par la plupart des laboratoires de routine. Elles font appel à la culture microbienne et au décompte des colonies bactériennes. Elles ne détectent que des formes végétatives ou des spores de *Clostridium* viables. Le dénombrement de *C. perfringens* se fait normalement après confirmation des colonies.

Les techniques de dénombrement, telles que définies par la norme NF EN ISO 7937, n'appliquent pas de choc thermique avant ensemencement et dénombrent donc principalement des formes végétatives.

Bien que des méthodes d'analyse de *Clostridium perfringens* existent, de nombreux laboratoires se limitent à la recherche des bactéries « anaérobies sulfito-réductrices » ce qui n'est pas satisfaisant car cette catégorie peut recouvrir des bactéries aéro-anaérobies très éloignées des *Clostridium sp.* et encore plus de *C. perfringens*. Il ressort de ce constat que l'indicateur *C. perfringens* demeure un indicateur pertinent mais présente des limites. Les laboratoires disposent de plusieurs types d'analyse : « recherche de spores de *C. perfringens* », « recherche de formes végétatives de *C. perfringens* », « dénombrement de *C. perfringens* », « dénombrement de *Clostridium sp.* », « dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices ». Or, ces dénominations ne sont pas équivalentes et les buts recherchés ne sont pas les mêmes. Cela peut entraîner des différences de résultats d'analyse et des difficultés d'interprétation des résultats entre les pétitionnaires et les experts.

7.2. Interprétation des résultats

Comme cela a déjà été souligné, la seule lecture du résultat du critère *Clostridium* ne peut être conclusive quant à l'hygiénisation ou l'absence de danger dans une MFSC.

C'est l'association de plusieurs microorganismes (représentatifs de plusieurs familles de résistances variées aux traitements et dans l'environnement), la prise en compte de l'origine des matières premières et des usages qui permet une conclusion.

Par ailleurs, la variabilité intra-lots des MFSC est connue. L'hétérogénéité des matières premières et des produits est responsable de cette variabilité qui influe sur la fiabilité des résultats.

Le groupe de travail propose de mettre en œuvre un protocole inspiré du fascicule documentaire NF U 44-169 (AFNOR, 2009). Ce protocole définit des écarts admissibles pour les critères microbiologiques.

Pour l'ensemble des formes végétative et sporulée, deux seuils pour *Clostridium perfringens* sont retenus. Les écarts admissibles suivants pourraient être proposés :

	Légumes fraises et, prairies et gazons	Toutes cultures sauf légumes fraises et, prairies et gazons
<i>Clostridium perfringens</i> (nombre de spores et de formes végétatives)	m = 10 /g M = 100/g n = 3 c = 1	m = 100 /g M = 1000 /g n = 3 c = 1

- m = valeur seuil donnée pour la somme des spores et cellules végétatives par gramme. Tous les résultats d'analyses égaux ou inférieurs à ce chiffre sont considérés comme satisfaisants, tous les résultats supérieurs à ce chiffre sont considérés comme non satisfaisants sans pour autant être inacceptables.

- M = seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme acceptables, pour la somme des spores et cellules végétatives par gramme.
- n = nombre d'échantillons soumis à l'analyse pour évaluation du lot de produit.
- c = nombre maximal d'échantillons donnant des valeurs supérieures à m mais acceptables (inférieures à M).

Exemples de résultats pour une application sur légumes, fraises et, prairies et gazons dans le cadre du présent document :

Légumes fraises et, prairies et gazons	Cas positif (Somme des spores et cellules végétatives/g)	Cas négatif (Somme des spores et cellules végétatives/g)
Analyse 1 :	< 10 /g	< 10 /g
Analyse 2 :	< 10 /g	20 /g
Analyse 3 :	80 /g	30 /g
<i>Conclusion</i>	Produit conforme aux critères (2 résultats satisfaisants et 1 résultat non satisfaisant mais acceptable)	Produit non conforme aux critères (1 résultat satisfaisant et 2 résultats non satisfaisants mais acceptables)

Cet exemple illustre le cas d'un épandage précédant la culture en année N. Il faudrait également déterminer un délai entre l'épandage et l'implantation de la culture dans le cas où pour l'année N+1 ou N+2, une culture de légumes, fraise, prairie et gazon serait implantée.

8. Conclusion : utilisation de *Clostridium perfringens* dans l'établissement de critères de références destinés à indiquer le risque microbien pour les MFSC

Les MFSC contiennent une large diversité de microorganismes. Certains d'entre eux présentent un danger pour l'homme et les animaux. Les mieux identifiés proviennent des matières fécales. Ces microorganismes sont nombreux, parfois difficiles à analyser même de manière sporadique. Certains d'entre eux ont été identifiés comme prioritaires et sont proposés pour analyse lors de la constitution des dossiers de demande d'homologation (salmonelle, *Listeria monocytogenes*, œuf de nématode). L'objectif visant à quantifier l'ensemble des pathogènes s'avère irréaliste. De ce fait il est proposé de suivre quelques microorganismes représentatifs de l'ensemble de la population microbienne considérés comme des indicateurs de contamination ou d'efficacité de traitement.

Au regard de la diversité des microorganismes qu'ils représentent, il n'existe pas d'indicateur unique et universel. Seule une analyse multi-critères peut permettre de statuer sur l'innocuité d'un produit.

C. perfringens, par son caractère pathogène reconnu, par la grande résistance de ses spores, leur ubiquité et leur détection relativement aisée présente des caractéristiques qui en font un bon indicateur de contamination microbienne d'origine animale ou fécale, et d'efficacité de traitement hygiénisant.

C. perfringens en tant que pathogène :

Selon la littérature consultée, aucun des cas de foyers d'infections humaines liés aux MFSC (notamment effluents d'élevages) qui est rapporté, n'implique *C. perfringens*. Il en résulte qu'aux teneurs habituelles des effluents d'élevage (environ $10^3 - 10^4$ germes de *C.*

perfringens par gramme) le risque pour l'homme peut être considéré comme faible. Il en va de même pour l'animal : aucun accident lié à *C. perfringens* n'est rapporté à la suite de l'utilisation d'effluents d'élevage comme fertilisant dans les exploitations agricoles. Cependant, aucune étude de risque spécifique liée à *C. perfringens* n'a été trouvée. Il est alors jugé impossible de fixer un seuil absolu garantissant l'innocuité des MFSC au regard de *C. perfringens*.

C. perfringens comme indicateur de traitement :

Un abattement de $5 \log_{10}$ de la teneur en *C. perfringens* dans un produit fini est considéré comme un critère validant un bon traitement hygiénisant d'une matière fertilisante. La concentration habituellement rencontrée dans les produits organiques non traités ($1.10^3 - 1.10^4$ de formes végétatives et de spores de *C. perfringens* par gramme) ne permet donc pas en règle générale d'utiliser ce microorganisme pour la validation des traitements. Son utilisation reste cependant possible lorsque *C. perfringens* se retrouve à des teneurs élevées dans le produit fini.

C. perfringens comme indicateur de contamination microbienne d'origine fécale ou carnée :

Pour les MFSC qui contiennent des matières premières d'origine fécale ou carnée, si le procédé de fabrication ne met pas en œuvre de traitement hygiénisant, il est indispensable de réaliser une analyse des dangers et des risques pour l'homme, les animaux et l'environnement. Cette analyse devrait concerner a minima les pathogènes proposés dans le cadre du Guide de constitution des dossiers de demande d'homologation et devrait être élargie, en cas de dangers spécifiques relatifs au produit ou à ses matières premières. Un plan de surveillance du produit devrait être proposé.

Pour les MFSC qui ne contiennent pas de matières premières d'origine fécale ou carnée, si le procédé de fabrication ne met pas en œuvre de traitement hygiénisant, il est indispensable de produire une analyse des dangers et des risques pour l'homme, les animaux et l'environnement en dehors des microorganismes d'origine fécale ou carnée. L'analyse de référence devrait tout de même porter sur ces derniers microorganismes, leur absence signalant des non-contaminations externes lors de la production.

En conclusion, *C. perfringens* étant le seul microorganisme à produire une forme de résistance sporulée (représentant ainsi les microorganismes ayant des formes de résistance) parmi les indicateurs retenus dans le cadre de l'homologation, il semble pertinent de conserver ce paramètre dans les analyses à fournir lors des demandes d'homologation. La valeur actuellement en vigueur est l'absence de *C. perfringens* dans les produits quel que soit l'usage des MFSC. Or, certains usages sont plus sensibles au regard du risque microbiologique (aliments consommés crus par exemple) que d'autres. Il paraît donc justifié de fixer deux valeurs en fonction des usages agricoles, comme c'est déjà le cas pour les indicateurs que sont *E. coli* et les entérocoques. Ce changement induit une quantification du microorganisme et la réalisation d'une analyse présence/absence. Les méthodes d'analyse par dénombrement ayant un seuil de détection de 10 *C. perfringens* (formes végétatives et spores) par gramme de produit, il est proposé que ce seuil, qui est le plus exigeant, soit appliqué aux cultures les plus sensibles au regard du risque microbiologique. Pour les autres cultures, l'application d'un seuil de 100 *C. perfringens* (formes végétatives et spores) par gramme de produit est jugée acceptable.

Ces valeurs de référence doivent être respectées lors de la mise sur le marché. La phase de stockage des produits est donc incluse et ne doit pas permettre de recontamination.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'ANSES

L'homologation et la normalisation des MFSC retiennent des valeurs de référence pour les teneurs de certains microorganismes. Ces valeurs de référence, parfois divergentes, sont issues de processus de décisions différents. Les analyses scientifiques dont elles découlent méritent d'être régulièrement actualisées. Partant de ce constat, l'Anses a mené une réflexion sur les critères et les seuils microbiologiques concernant les MFSC notamment, pour les recommandations relatives à la constitution de dossier de demande d'homologation.

Le travail réalisé sur le critère *C. perfringens* constitue une étape dans l'actualisation des critères microbiologiques pour l'homologation des MFSC.

Compte tenu des limites actuelles dans les analyses de routine et *C. perfringens* étant le seul microorganisme à produire une forme de résistance sporulée parmi les indicateurs retenus dans le cadre de l'homologation, l'Anses recommande de conserver ce paramètre dans les analyses à fournir lors des demandes d'homologation.

La valeur actuellement en vigueur est l'absence de *C. perfringens* dans les produits quel que soit l'usage des MFSC. Toutefois, dans la pratique, la méthode de dénombrement a une limite de détection de 10 ufc par gramme. Par ailleurs, certains usages sont plus sensibles au regard du risque microbiologique (aliments consommés crus par exemple) que d'autres.

Ainsi, l'Anses propose d'utiliser le nombre de colonies de *C. perfringens*, comme l'un des indicateurs microbiologiques pour évaluer l'innocuité des Matières Fertilisantes et Supports de Culture. Les seuils à ne pas dépasser, selon les méthodes NF EN ISO 7937 ou LV 02-9502 (1995), sont les suivants (cf NF U 44-169 (AFNOR, 2009) :

- 10 colonies de *C. perfringens* (formes végétatives et spores) par gramme de produit pour les cultures les plus sensibles (légumes, fraises, gazons et prairies) au regard du risque microbiologique. Ce seuil est celui des méthodes d'analyse par dénombrement et est considéré suffisamment protecteur en terme de sécurité sanitaire,
- 100 colonies de *C. perfringens* (formes végétatives et spores) par gramme de produit pour les autres cultures (grandes cultures, arboricultures, viticulture, petits fruits, sylvicultures, pépinières ornementales, cultures florales).

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Clostridium perfringens, indicateur, agent pathogène, danger microbien, hygiénisation, matières fertilisantes.

BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Orf MM., Brewster J, Oleszkiewicz J, Reimers RS, Lagasse P, Amy B, Glindemann D 2004, Production of class A biosolids with anoxic low dose alkaline treatment and odor management. *Water Science and Technology* . 49 (10) : pp. 131-138
- AFNOR, 1993, NF EN ISO 26461-2 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (clostridia) - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane.
- AFNOR, 1995, NF U 44-095 : Amendements organiques : Composts contenant des matières d'intérêt agronomique, issues du traitement des eaux.
- AFNOR, 2005, NF EN ISO 7937 : Microbiologie des aliments, Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens*, Technique par comptage des colonies.
- AFNOR, 2009, FD NF U 44-169 : Amendements organiques et supports de culture - Analyses microbiologiques - Echantillonnage et grille de lecture des résultats.
- AFNOR, 2010, NF U 44-051 : Amendements organiques : Dénominations, spécifications, marquages.
- Afssa, 2003, Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique. Rapport AFSSA 164 p.
- Afssa 2006, Fiche de description de danger transmissible par les aliments : *Clostridium perfringens*, 4 p.
- ANONYME 1998, Arrêté Ministériel du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-113 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées.
- Barbe J., Brocheton, D., Kockmann, F., Wiart, J., 2001, Les boues chaulées des stations d'épuration municipales. Ed. Ademe n° 3831, 224 p.
- Brett M., Rodhouse J., *et al.*, 1992, Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea, *Journal of Clinical Pathology*, 45: pp. 609-611.
- Byrne B, Dunne G, Bolton DJ. 2006, Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiology*.: 23 (8): pp. 803-808.
- Bustamante M.A., R. Moral, C. Paredes, M.C. Vargas-García, F. Suárez-Estrella and J. Moreno. 2008, Evolution of the pathogen content during co-composting of winery and distillery wastes. *Bioresource Technology*. 99 (15) : pp. 7299-7306.
- Canada J.C., Strong, D.H., Scott, L.G., 1964, Response of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells to temperature variation. *Applied microbiology* 12, pp. 273-276.
- Carrington E., 2003, Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction. Final Report (study contract n° 3040/2001/322179/MAR/A2) for the European Commission Directorate- General Environment ISBN 92-894-1734-X.
- CSHPF 1998, Risques sanitaires liés aux boues d'épuration des eaux usées urbaines. Section des eaux, Ministère du Travail et des Affaires Sociales. Dir. Gén. de la Santé. Ed. Lavoisier Tech & Doc.
- Dabert, P., Pourcher, A.-M., Bouchez, T., 2009, Qualité sanitaire des rejets des élevages porcins : évaluation des filières de traitement biologique du lisier en bactériologie et microbiologie moléculaire. Rapport final contrat Ademe 05 75 C 0031, 102 p.
- Delagoutte C., 2008, Les toxi-infections alimentaires collectives. Cuisine collective juin/juillet.
- Delery 2005, Evaluation des risques sanitaires liés aux agents pathogènes, Rapport INERIS, 92 p.
- Dorioz, J.-M., Pringent -Combaret, C., Trévisan, D., Texier, S., Fremeaux, B., Poulenard, J., Quentin, P., Vernozy-Rozand, C., Moëne-Locez, Y., Jocteur-Monrozier, L., 2006, Pratiques pastorales et qualité microbiologique des eaux à l'échelle bassin versant : rôle des facteurs pédoclimatiques et hydrométéorologiques dans la

- survie, l'état physiologique et le transfert des populations de bactéries fécales bovines. Rapport intermédiaire du programme de recherche Gessol, in Ouvrage collectif « Gestion Durable des Sols », coordinateurs, L. Citeau, A. Bispo, M. Bardy et D. King. Editions Quae, 2008, p 258.
- EFSA 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs. Question N° EFSA-Q-2004-009. In The EFSA Journal, pp. 1-65.
- EPA 1999, Control of Pathogens and vector attraction in sewage sludge US EPA, Washington DC.
- Elissalde, N., Wiart, J., Feix, I., 1994, Les germes pathogènes dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines. Ed. Ademe n° 1798, 90 p.
- Foliguet, J.-M., L. Schwartzbrod et O.G. Gaudin, 1966, Bulletin de l'OMS, n°35, pp. 737-749.
- Guan, T.Y., Holley, R.A., 2003, Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness -A Review. J Environ Qual 32, pp. 383-392.
- Gessler F., Bohnel H., 2006, Persistence and mobility of a *Clostridium botulinum* spore population introduced to soil with spiked compost FEMS Microbiology Ecology, 58 (3): pp. 384-393.
- Gubert A.K., J.S. Karns, Y.A. Pachepsky, A.M. Sadeghi, J.S. Van Kessel and T.H. Dao. 2007, Comparison of release and transport of manure-borne *Escherichia coli* and enterococci under grass buffer conditions. Letters in Applied Microbiology. 44 : pp. 161-167.
- ICMSF, 1996, microorganisms in foods 5 : microbiological specification of food pathogens. Blackie Academic and Professional. An Imprint of Chapman & Hall, London, 524 p.
- INERIS, 2007, Evaluation quantitative des risques sanitaires pathogènes pour *Enterovirus*, *Salmonella non typhi*, *E. coli O157-H7*, *Cryptosporidium parvum* et prion liés à l'épandage des boues de stations d'épuration, INERIS DRC 05-55079, Annexe B, p 57.
- INERIS, ADEME, SYPREA, FP2E, 2007, Méthodologie d'évaluation des risques sanitaires des filières d'épandage des boues urbaines et industrielles : élaboration et application au cas des prescriptions du projet de directive européenne et de la réglementation française. Rapport final., convention ADEME, I., SYPREA, FP2E n°0375C0093, ed.
- InVS, I.d.v.s., 2003, Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France. Rapport InVS, 192 p.
- Juneja V.K and B.S. Marmer, (1998). Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* vegetative cells in ground beef and turkey as affected by sodium pyrophosphate, Food Microbiol. 15 : pp. 281–287.
- Juteau, P., Tremblay, D., Ould-Moulaye, C., Bisailon, J.-G., Beaudet, R., 2004, Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors. Water Research 38, pp. 539-546.
- Keyburn AL., Boyce JD., Vaz P., Bannam TL., Ford ME., Parker D., Di Rubbo A., Rood JI., Moore RJ., 2008, NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. PLoS Pathog. 4(2) : p 26.
- Lorthios, P., 1998, Hygiénisation de fumiers d'ovins lors du compostage. Colloque Ademe Le compostage à la ferme des effluents d'élevage, faisabilité technique et valorisation agronomique, 15 décembre 1998, Paris.
- Manteca Villanueva, C., 2004, Etude étiologique de l'entérotoxémie bovine. Ann. Med. Vet. 148, pp. 16-20.
- Meals D W. and D. C. Braun. 2006, Demonstration of Methods to Reduce E. coli Runoff from Dairy Manure Application Sites. J. Environ. Qual. 35: pp.1088-1100.
- Muirhead R.W, Collins R.P. and P.J. Bremer. 2006, Numbers and transported state of *Escherichia coli* in runoff direct from fresh cowpats under simulated rainfall. Letters in Applied Microbiology 42: pp. 83-87.

- Mustin, M., Augustin, J.-C., Carlier, V., Nassr, N., 2008, Etude de l'identification des dangers et risques biologiques des matières premières animales utilisées en compostage. Rapport final contrat Ademe/CAS/ FNADE/ SYPREA/UNIFA/UPJ n° 05 75 C 0031, 108 p.
- NRC 2002, Advancing standards and practices, 266 p.
- NRC 2007 (NCBI: Center for Biotechnology Information) page internet.
- Pachepsky Y.A., A.M. Sadeghi , S.A. Bradford , D.R. Shelton A.K. Guber , T. Dao 2006, Transport and fate of manure-borne pathogens: Modeling perspective. agricultural water management 86 : pp. 81-92.
- Philippeau, C., Goncalves, S., Julliand, V., 2004, Entérotoxémies des bovins charolais en Bourgogne : élaboration d'une grille de diagnostic bactériologique et recherche des hypothèses de facteurs de risque. Renc. Rech. Ruminants 11, 321-324.
- Pourcher A. M., C. Burton, C. Ziebal, A. De-Guardia. 2008, Impact of temperature-time combinations on enteric bacteria in separated solids from pig manure 13th RAMIRAN International Conference. Albena Bulgaria 11-14 juin 2008 : pp. 199-203
- Pourcher A. M., F. Picard-Bonnaud, V. Ferré, A. Gosinska, V. Stan, G. Moguedet, 2007, Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. Applied Soil Ecology 35, pp. 473-479.
- Rimhanen-Finne R., Vuorinen A., Marmo S., Malmberg S., Hänninen M. L., 2004, Comparative analysis of *Cryptosporidium*, *Giardia* and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting process. Letters in appl. Microbiology, 38: pp. 301-305.
- Sarker M., Shivers R. *et al.*, 2000, Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plamid genes versus chromosomal enterotoxin genes, Appl. Env. Microbiology, 66 (8): pp. 3234-3240.
- Schotte U., Truyen U, Neubauer H, 2004, Significance of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors – A review. J. Vet. Med. B51, pp. 423-426.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J., Godon, J., 2008, Behaviour of pathogenetic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. Water research 42, pp. 53-62.
- Williams A.P., H. Gordon, D.L. Jones, N.J.C. Strachan, L.M. Avery and K. Killham. 2008, Leaching of bioluminescent *Escherichia coli* O157:H7 from sheep and cattle faeces during simulated rainstorm events. Journal of Applied Microbiology 105 ; 1452-1460.
- Who, 2006, Guideline for the safe use of wastewater, excreta and grey water. Volume 2 wastewater use in agriculture. WHO Eds, 196 p.