

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Bacillus spp dans l'eau

Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* spp dans l'eau destinée à la consommation humaine délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord - Pas-de-Calais)

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2012

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Bacillus spp dans l'eau

Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* spp dans l'eau destinée à la consommation humaine délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord - Pas-de-Calais)

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2012

Édition scientifique

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

relatif aux risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* spp. dans l'eau destinée à la consommation humaine délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (nord-pas de calais)

L'Anses 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.

L'Anses a été saisie le 1er juin 2011 par la Direction générale de la santé (DGS) d'une demande d'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* spp. dans l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH) délivrée par l'usine de production d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas de Calais).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans le cadre du contrôle sanitaire des EDCH, la réglementation prévoit la recherche de bactéries sulfito-réductrices, y compris les spores, sur les points de mise en distribution et aux points d'usage. En pratique, les laboratoires agréés au titre du contrôle sanitaire des EDCH mettent en œuvre les conditions opératoires décrites dans la norme NF EN 26461-2 « Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*) ». Seules les colonies de couleur noire sont prises en compte dans l'expression des résultats. La norme n'évoque pas le dénombrement ou l'identification des colonies atypiques.

Le suivi hebdomadaire, effectué par le laboratoire de veilles sanitaire et écologique de Lille métropole communauté urbaine (LMCU), des EDCH produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys a mis en évidence la présence de colonies atypiques lors de la recherche et du dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*). Cette constatation a été faite à partir du mois d'août 2010, sans constater de non-conformité pour les paramètres microbiologiques réglementaires prévus par l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des EDCH mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique. Le LMCU a décidé de faire identifier les colonies atypiques observées.

Le laboratoire de l'Institut Pasteur de Lille (IPL), chargé de l'identification des bactéries issues des colonies atypiques observées, a identifié plusieurs *Bacillus* : *B. thermoamylovorans*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. vireti*, *B. borstelensis*, *B. fucosivorans*, et *Roseomonas genomospecies*, *Staphylococcus epidermidis*¹, *Paenebacillus spp.* ainsi que des *B. cereus* dans deux prélèvements d'eau brute provenant de la Lys.

La présence de *Bacillus cereus* dans certains aliments est connue pour provoquer des symptômes diarrhéiques et émétiques (Anses, 2011). Cependant, les *Bacillus spp.* ne font pas partie des paramètres microbiologiques des limites et références de qualité réglementaires des EDCH.

La DGS a transmis à l'Anses une note qui précise les éléments attendus par l'Agence régionale de santé (ARS) du Nord-Pas de Calais à l'origine de la saisine. La dernière de ces questions portant sur « *la conduite à tenir en cas de découverte de toute autre bactérie non recherchée habituellement dans l'eau* » ne peut trouver de réponse générale. Chaque situation doit être étudiée au cas par cas, en fonction du contexte et des bactéries mises en cause. La question ne sera donc pas traitée dans le cadre de cette expertise.

L'Anses a sollicité le pétitionnaire afin d'obtenir des informations complémentaires sur l'évolution de la situation, sur l'existence d'événements particuliers survenus pendant l'été 2010 et sur d'éventuelles améliorations de la filière de traitement. La demande est restée sans réponse au 20 octobre 2012.

L'expertise porte sur les risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* dans l'EDCH délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys et plus particulièrement sur les différentes espèces de *Bacillus* identifiées, vis-à-vis de la population générale et de la (ou des) population(s) sensible(s) le cas échéant. Elle a pris en compte les usages alimentaires de l'eau. Les performances de la filière de traitement mise en œuvre à l'usine d'Aire-sur-la-Lys ont été examinées notamment au regard des *Bacillus spp.*

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) ».

Les questions posées par l'ARS ont été examinées et cadrées avec le bureau de l'eau de la DGS après transmission de la saisine.

Le présent avis a été établi sur la base d'un rapport initial rédigé par trois rapporteurs, présenté au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux » le 6 septembre 2012, puis validé par voie électronique.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1. Description du danger lié aux *Bacillus spp.* et aux genres apparentés

3.1.1. Les espèces isolées dans les EDCH d'Aire-sur-la-Lys

Les *Bacillus spp.* sont des bacilles aéro-anaérobies facultatifs. Ils ont une importante capacité à produire des spores résistant à des conditions environnementales défavorables (Logan et De Vos, 2009a). Les spores de nombreuses espèces de *Bacillus spp.*

¹ Les experts souhaitent attirer l'attention sur l'incohérence de retrouver *Staphylococcus epidermidis* après un traitement thermique à 75°C pendant 15 minutes.

(notamment *B. cereus*) sont abondantes dans le sol (Guinebretiere *et al.*, 2003; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Parmi les *Bacillus* isolés dans les eaux non traitées d'Aire-sur-la-Lys, le groupe *B. cereus* rassemble plusieurs espèces génétiquement très proches, définies empiriquement sur des critères phénotypiques (*B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus* au sens strict, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*). Même s'il est génétiquement et taxonomiquement très proche de *B. cereus* au sens strict, *B. anthracis* présente une écologie totalement différente et sa présence dans l'environnement est liée à l'existence d'infection chez les animaux (Fasanella *et al.*, 2010). La présence de spores de *B. cereus* ne préjuge pas de la présence de spores de *B. anthracis*.

B. licheniformis et *B. subtilis* sont fréquemment à l'origine d'altération des aliments ayant reçu un traitement thermique. *B. circulans* est phylogénétiquement très proche de *B. lentus* et *B. firmus*. *B. thermoamylovorans* est peu connu et n'a été décrit qu'à partir d'un seul isolat. *B. vireti* a été isolé dans des échantillons de sol de prairies (Logan et De Vos, 2009a).

Les *Paenibacillus* spp. et *Brevibacillus* spp. sont des bacilles à coloration de Gram positive, producteurs d'endospores, aéro-anaérobies facultatifs (Logan et De Vos, 2009a; Priest, 2009). Les deux genres font partie de la famille des *Paenibacillaceae* (Logan et De Vos, 2009b).

Les spores de *Bacillus* spp. et genres apparentés sont résistants aux désinfectants. A titre d'exemple, des spores de *B. cereus* exposées à une concentration de 200 mg/L d'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes² subissent une réduction de leur concentration d'environ 2 log (Beuchat *et al.*, 2005).

3.1.2. Espèces responsables de maladies chez l'Homme après ingestion

Les espèces de *Bacillus* spp. à l'origine de gastro-entérites

La plupart des gastro-entérites provoquées par les *Bacillus* (4^e cause de toxi-infections alimentaires en France), le sont par *B. cereus* et des espèces très proches comme *B. thuringiensis* (Delmas *et al.*, 2010; EFSA, 2005; Invs, 2011). D'autres espèces de *Bacillus* sont aussi à l'origine de gastroentérites d'origine alimentaire, bien que beaucoup plus rarement : *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*, (Apetroaie-Constantin *et al.*, 2009; EFSA, 2005; From *et al.*, 2007; From *et al.*, 2005; Kramer et Gilbert, 1989; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). Il ne peut être exclu que d'autres espèces et sous-espèces très proches de *B. subtilis* puissent aussi provoquer des gastro-entérites (Nakamura *et al.*, 1999; Priest *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1996). Cependant, aucune autre espèce du genre *Bacillus* ou d'autres genres apparentés n'a été identifiée comme cause de gastro-entérite (Logan et De Vos, 2009a).

Mécanismes des gastro-entérites provoquées par *Bacillus* spp.

Les gastro-entérites provoquées par *B. cereus* et les *Bacillus* spp. sont généralement bénignes, avec néanmoins de très rares cas mortels (EFSA, 2005). Elles résultent de deux mécanismes différents :

- Des toxi-infections dans le cas des syndromes diarrhéiques. Les cellules libres ou issues de spores ingérées se multiplient dans l'intestin où elles produisent des entérotoxines lysant les cellules de l'épithélium intestinal. La durée moyenne d'incubation est de 8 à 16 heures. Les principaux symptômes sont des diarrhées aqueuses, des douleurs abdominales, des nausées, durant généralement 24 heures (Anses, 2011; EFSA, 2005; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

² Ce couple temps de contact / concentration est très nettement supérieur à celui utilisé en désinfection d'EDCH (1 à 3 mg/L pendant 30 minutes).

- Des intoxications dans le cas des syndromes émétiques. La bactérie produit, lors de sa croissance dans l'aliment, un peptide toxique, la céréulide, très stable à la chaleur et aux pH extrêmes. L'ingestion de la toxine, même en l'absence de cellules bactériennes, provoque des nausées, vomissements, malaises, parfois accompagnés de diarrhées et douleurs abdominales (EFSA, 2011). Les symptômes surviennent dans les 30 minutes à 6 heures après ingestion (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Moins bien connu, le mécanisme conduisant aux gastro-entérites induites par les autres espèces de *Bacillus* semble être aussi une intoxication (EFSA, 2011).

Doses réponse

Dans le cas des toxi-infections diarrhéiques, la quantité de cellules ou spores de *B. cereus* pathogènes retrouvée dans les aliments incriminés est généralement égale ou supérieure à 10^5 par gramme ou millilitre et dans de très rares cas égale ou supérieure à 10^3 par gramme ou millilitre (EFSA, 2005; Kramer et Gilbert, 1989; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Dans le cas des intoxications émétiques, les toxines peptidiques sont très stables et peuvent persister dans l'aliment même si les bactéries ont disparu (EFSA, 2005). Un minimum de 10^5 cellules de *B. cereus* par gramme ou millilitre de l'aliment à un stade de sa production est nécessaire pour produire suffisamment de toxines et provoquer une intoxication.

De même, les pathologies d'origine alimentaire provoquées par *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, ont toujours été associées à une population importante de ces bactéries dans les aliments responsables, de l'ordre de 10^5 cellules ou spores par gramme (Kramer et Gilbert, 1989).

Sources des gastro-entérites causées par *Bacillus* spp.

Les aliments sont l'unique source identifiée dans la littérature à l'origine de toxi-infections et intoxications à *Bacillus* documentées (Anses, 2011; EFSA, 2005).

Aucune toxi-infection ni intoxication à *Bacillus* spp. n'a été identifiée dans la littérature comme associée à la consommation d'eau de boisson.

Les spores de *B. cereus* sont présentes dans quasiment toutes les catégories d'aliments. Les matières premières entrant dans la composition d'un produit fini, sont des sources potentielles de contamination.

La croissance de *B. cereus* (Rosenfeld *et al.*, 2005) et la production de toxines dans le cas d'intoxications émétiques (Agata *et al.*, 1999) nécessitent des milieux riches en acides aminés. Ces conditions ne sont pas réunies dans une matrice telle que l'eau de boisson.

Présence de *Bacillus* spp. dans l'eau

Les spores de nombreuses espèces de *Bacillus* (notamment *B. cereus*) sont abondantes dans le sol (Guinebretiere *et al.*, 2003; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Il est donc probable qu'une fraction soit entraînée vers les eaux de surface.

Selon plusieurs études (Baudin *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 1996), les eaux de surface et les eaux souterraines influencées peuvent contenir entre 150 et $2,5 \cdot 10^4$ spores de bactéries aérobies / 100 mL. Dans les eaux souterraines (Rice *et al.*, 1996), les concentrations varient entre <1 et 12 UFC/100 mL. Dans l'environnement, ces bactéries sont majoritairement présentes sous une forme sporulée très stable et capable de persister plusieurs années (Hendriksen et Hansen, 2002).

Parmi les espèces susceptibles d'être à l'origine de gastro-entérites, *B. thuringiensis*, *B. cereus* et des souches cytotoxiques de *B. subtilis* ont été décrites dans les eaux de

surface au Japon et en Norvège (Ichimatsu *et al.*, 2000; Ostensvik *et al.*, 2004), à des concentrations comprises entre 15 et 140 UFC/100 mL.

Ostensvik *et al.* (2004) remarquent que les procédés de traitement de l'eau mis en œuvre dans les filières étudiées (filtration et chloration) n'éliminent pas complètement les spores de *Bacillus*. Les échantillons d'eau du robinet révèlent la présence de spores à des concentrations comprises entre 15 et 38 UFC/100 mL.

Par ailleurs, les *Bacillus* spp. et genres apparentés peuvent être identifiés dans de l'EDCH issue de filières de traitement mettant en œuvre des procédés de désinfection conformes aux standards actuels (OMS, 2011). Ils ne sont pas recherchés spécifiquement mais peuvent être isolés sur les milieux de culture utilisés pour le dénombrement des *Escherichia coli*. Le genre *Paenibacillus* est également souvent identifié dans ces conditions.

Bacillus spp. responsable de maladies autres que des gastro-entérites chez l'Homme

Très largement répandus dans la nature, *B. cereus* et d'autres espèces de *Bacillus* sont responsables d'infections opportunistes chez des patients souffrant de pathologies graves ou lors de contaminations de champs opératoires. L'ingestion de spores ou de bactéries ne semble pas être la source de ces infections (EFSA, 2007; EFSA, 2008). La présence de *B. cereus* dans l'eau a été évoquée comme source de contamination dans des unités de soins des grands brûlés (Valentino et Torregrossa, 1995).

B. anthracis est à l'origine de la maladie du charbon chez l'Homme et les animaux, et peut provoquer la mort après ingestion en l'absence d'un traitement adapté (OMS, 2011). L'infection peut être contractée par voie respiratoire, cutanée, mais aussi par ingestion d'aliments (Fasanella *et al.*, 2010). En France, la fièvre charbonneuse des mammifères est une maladie réputée contagieuse qui donne lieu à déclaration et à l'application de mesures sanitaires (Décret n° 65-697 du 16 août 1965). Cependant la maladie du charbon n'a plus une incidence majeure dans les pays occidentaux même si quelques foyers sont susceptibles d'apparaître occasionnellement (Fasanella *et al.*, 2010).

Selon l'avis de l'Anses relatif aux mesures de gestion lors de suspicions de cas de fièvre charbonneuse, « l'apparition d'un foyer peut être due à :

- un phénomène « naturel »
 - o réémergence des spores sur la parcelle où le foyer s'est déclaré ;
 - o apport de matériel contaminé par des spores mais non issu d'un foyer (phénomène hydrologique, fourrage ou aliment du commerce contaminé, apport de terre contaminée, etc.).
- un lien épidémiologique avec un foyer non identifié : déplacement/achat d'animaux en incubation ou malades, prêt de matériel souillé, achat d'aliments contaminés, etc. » (Anses, 2010).

Innocuité de certaines espèces de Bacillus identifiées dans l'eau d'Aire-sur-la-Lys

Les *B. licheniformis* et *B. coagulans*, avec une qualification « absence de production de toxine » sont incluses dans la liste QPS (Qualified Presumption of Safety) tenue à jour par l'EFSA³. Le principe de cette liste est d'identifier les groupes de micro-organismes pour lesquels toutes les préoccupations sanitaires éventuelles ont pu être écartées, en vue de leur utilisation dans la chaîne de production des aliments. Lorsqu'un agent biologique de cette liste est notifié à l'EFSA pour utilisation particulière, il n'est plus nécessaire de procéder à l'évaluation complète de son innocuité (EFSA, 2007; EFSA, 2008; EFSA, 2009; EFSA, 2010). Les espèces non inscrites sur la liste après évaluation peuvent avoir été écartées en raison de l'existence de dangers, mais le plus souvent au motif d'un manque de connaissances disponibles permettant d'étayer l'innocuité de l'espèce.

³ European Food Safety Authority

3.2. Métrologie des *Bacillus* spp.

3.2.1. Les méthodes d'analyse mises en œuvre

Selon la norme NF EN 26461-2, le terme *Clostridia* désigne les « micro-organismes anaérobies formant des spores et sulfito-réducteurs, appartenant à la famille des Bacillacées et au genre *Clostridium* ». La méthode consiste à sélectionner les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (BASR) dans un échantillon d'eau, par chauffage d'une durée de 15 minutes à la température de 75°C (+/- 5°C) pour détruire les formes végétatives. L'échantillon est ensuite filtré sur membrane qui sera incubée en anaérobiose selon la norme NF EN 26461-2. Les colonies noires, produisant de l'hydrogène sulfuré, sont dénombrées en tant que spores de micro-organismes sulfito-réducteurs.

Le LMCU, la Société des eaux du nord (SEN) et l'IPL mettent en œuvre un protocole correspondant à la norme NF EN 26461-2. La SEN et l'IPL ont ajouté une incubation supplémentaire de 24 à 48 h en aérobie pour permettre l'identification des bactéries formant des colonies atypiques.

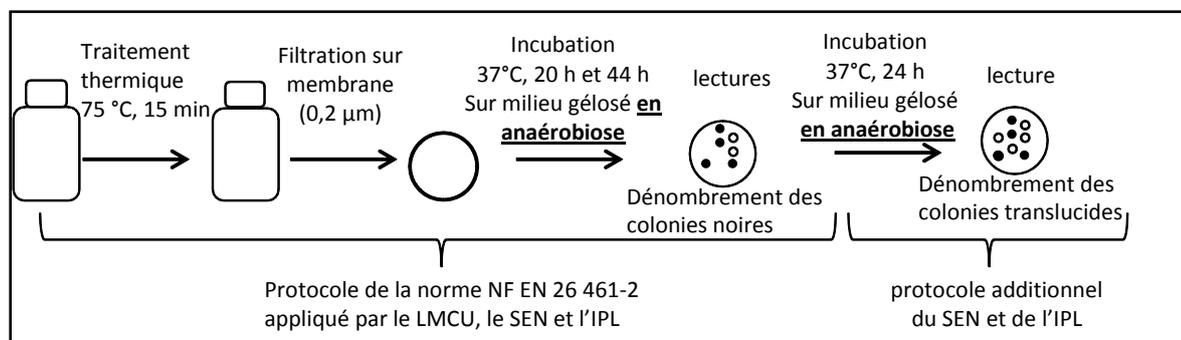


Figure 1 Schéma de la méthode d'analyse mise en œuvre

3.2.2. Les résultats

Le suivi hebdomadaire, par le LMCU, des EDCH produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys a mis en évidence la présence de colonies atypiques lors de la recherche et du dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs selon la norme NF EN 26461-2. Ces résultats ont été confirmés par la SEN et l'IPL. Les analyses montrent la présence de colonies atypiques identifiées comme étant des *B. thermoamylovorans* pour la grande majorité. Par la suite, une pratique déviante de la norme est intervenue en ajoutant une incubation complémentaire en aérobie favorisant la croissance d'un plus grand nombre de colonies atypiques.

Les identifications par séquençage de l'ADN ribosomal 16S, réalisées par l'IPL sur les colonies atypiques isolées par les différents laboratoires, ont également mis en évidence la présence de *B. licheniformis*, *B. borstelensis*, *B. fucosivorans*, *Roseomonas genomospecies*, *B. vireti*, *Paenebacillus* spp. et *Staphylococcus epidermidis*.

D'après la bibliographie (OMS, 2011; Ostensvik *et al.*, 2004) et selon l'avis des experts nommés sur cette saisine, la présence de *Bacillus* spp. dans les EDCH n'est pas exceptionnelle. Elle est souvent observée lorsque les usines de production d'EDCH utilisent des eaux de surface. Cependant les spores de bactéries aérobies ne font pas partie des indicateurs d'efficacité de traitement retenus par le législateur.

B. cereus, responsable de la majorité des cas de gastroentérites provoqués par la présence de la bactérie dans les aliments, n'a été trouvée que dans les eaux brutes et non dans les EDCH produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys. La seule bactérie connue comme pouvant provoquer des gastro-entérites qui ait été identifiée dans les EDCH produites par cette usine est *B. licheniformis*. Aucun cas de gastro-entérite associé à la présence de

Bacillus dans l'eau produite par l'usine d'Aire-sur-la-Lys et plus généralement dans les EDCH n'a cependant été rapporté.

3.3. La filière de traitement de l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas de Calais)

L'eau délivrée par l'usine des eaux d'Aire-sur-la-Lys (SMAEL-Syndicat mixte d'adduction des eaux de la Lys) transite par une conduite de refoulement d'une longueur de 45 km. Les espèces de *Bacillus* observées ont été mises en évidence à partir d'échantillons prélevés en différents points de cette conduite à partir du 19 août 2010. La conduite arrive à la station de refoulement de Prêmesques et les eaux sont notamment achetées par le LMCU. Le réservoir de Prêmesques est le point d'entrée des réseaux du syndicat de communes délégués à la Société des Eaux du Nord et au réseau du SMAEL.

3.3.1. Description de la filière de traitement

L'eau brute pompée dans la Lys reçoit une injection de permanganate de potassium pour limiter la présence d'algues et de matières organiques. En cas de forte augmentation des matières en suspension, une injection de chlorure ferrique est prévue pour faciliter la décantation dans la réserve d'eau brute.

En sortie de cette réserve, l'eau passe par deux décanteurs. Le coagulant utilisé est du chlorure ferrique. Il n'y a pas d'utilisation d'adjuvant de floculation. Une injection de charbon actif en poudre est possible à ce stade.

L'eau transite ensuite à travers 8 filtres à sable garnis d'une hauteur de 1 m de matériau. La vitesse de filtration varie entre 2,6 et 4,2 m/h lorsque tous les filtres sont en service. Elle peut atteindre 5,2 à 8,3 m/h en cas de lavage ou d'indisponibilité de certains filtres. Les filtres sont lavés à contre-courant à l'air et à l'eau et les eaux de lavage sont acheminées dans un bassin de décantation dont le surnageant est renvoyé en tête d'usine.

L'eau est ensuite désinfectée par ozonation dans 2 tours parallèles à 2 compartiments de 6 minutes de temps de contact. Le taux de traitement en ozone est ajusté de manière à maintenir un résiduel de 0,4 mg/L en sortie des tours d'ozonation. Un pilotage basé sur le maintien d'une valeur de CT⁴ est réalisé afin de réduire la formation de bromates. Une injection de bisulfite de sodium est réalisée en sortie de tour d'ozonation afin de neutraliser l'ozone résiduel.

En dernière étape, du chlore est injecté en amont d'une bache de stockage de 5 000 m³ de façon à obtenir un résiduel de 0,4 mg/L en sortie. La bache est dimensionnée pour permettre un temps de contact de 1 h au débit nominal de l'usine et 2 h au débit de fonctionnement habituel, ce qui permet d'assurer des CT suffisants pour induire un effet bactéricide et virucide. L'eau est ensuite déchlorée par injection de bisulfite de sodium avant son refoulement vers le réservoir de Prêmesques.

3.3.2. Amélioration prévue de la filière

La construction d'un débourbeur en amont du bassin de stockage d'eau brute était prévue avec une mise en service au 1^{er} trimestre 2011. Il était également prévu l'injection de chlorure ferrique et de polymère (floculant) en amont de ce débourbeur. Les informations disponibles au moment de cette expertise ne permettent pas de savoir si cette modification de la filière est effective à la date de publication du présent avis.

⁴ La règle du CT exprimée en mg·L⁻¹·min (C= concentration en désinfectant, T=temps de contact) est utilisée pour optimiser la quantité de désinfectant requise pour désinfecter l'eau.

3.3.3. Analyse critique de la filière de traitement et de son fonctionnement

La filière de traitement est dimensionnée pour traiter 100 000 m³/j. Néanmoins :

- les vitesses de filtration peuvent parfois être élevées notamment en cas de lavage de filtres, ce qui est susceptible de provoquer des à-coups hydrauliques et des décrochements de micro-organismes retenus par les matériaux filtrants ;
- les eaux de lavage des filtres sont simplement décantées sans ajout de réactif chimique avant recyclage en tête de filière. Cette pratique soumet les filtres à une charge en micro-organismes plus importante que celle de l'eau brute, et limite les capacités de rétention de ces micro-organismes par les filtres ;
- les résultats des analyses de surveillance sur la période considérée montrent une variation de la qualité de l'eau produite par l'usine notamment pour ce qui concerne la turbidité et le pH.

Le dénombrement des spores de BASR est un indicateur d'efficacité de filtration, notamment vis-à-vis de *Cryptosporidium*. L'arrêté du 11 janvier 2007⁵ fixe une référence de qualité de 0 UFC / 100 mL pour les EDCH.

À Aire-sur-la-Lys, les analyses de surveillance sur l'eau filtrée ont mis en évidence dans 3 prélèvements sur 4 la présence de spores de BASR (entre 2 et 4 UFC/100 mL), ce qui révèle une fragilité au niveau de l'étape de filtration. Les variations de turbidité observées peuvent également témoigner d'un traitement de clarification non optimisé.

Les étapes d'ozonation et de chloration de cette filière de traitement n'ont que peu d'effets sur les spores de BASR.

Même si aucun oocyste de *Cryptosporidium* n'a été détecté dans l'eau traitée par l'usine, des réserves sur la maîtrise de l'étape de filtration de cette usine peuvent être émises.

Les spores de bactéries aérobies sont souvent retrouvées dans les filières de traitement d'EDCH. Leur grande résistance aux traitements de désinfection chimique classiquement utilisés dans ces filières peut expliquer leur présence dans des eaux traitées. De plus, il a été montré que ces bactéries pouvaient se développer au cours du processus de traitement notamment lors des étapes de filtration (Baudin *et al.*, 2008). Concernant l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys, la filière de traitement ne semble pas avoir présenté un fonctionnement optimal face à la rétention de ces spores ainsi que celle de BASR. Cependant, il est difficile d'en appréhender complètement les raisons sur la base des éléments disponibles. Aucune indication n'est donnée dans le dossier transmis en appui à la saisine sur des interventions éventuelles (travaux, nettoyages, *etc.*) ayant pu avoir lieu avant la période de mise en évidence de bactéries sporulées cultivant après une incubation complémentaire en aérobiose, dans le cadre de la surveillance de l'exploitant.

3.4. Évaluation du risque

3.4.1. Exposition

A ce jour, l'eau de boisson n'est pas identifiée comme une source d'infection par des *Bacillus* spp. pathogènes, incluant *B. cereus*. La possibilité de transmission de *Bacillus* par voie hydrique n'est pas prouvée (OMS, 2011).

Les infections à *Bacillus* spp. sont majoritairement associées à la consommation de certains aliments. Les pathologies résultent généralement de l'ingestion d'une importante quantité de cellules de la bactérie ou des toxines qu'elle peut produire (EFSA, 2005; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Ces conditions sont susceptibles d'être réunies en fin de phase de croissance des *Bacillus* spp. pathogènes. *B. cereus* est l'une des espèces

⁵ Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionné aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique.

pathogènes de *Bacillus* les mieux documentées. C'est l'espèce la plus souvent mise en cause dans les intoxications alimentaires provoquées par des *Bacillus*.

Selon l'EFSA (2005), les *B. cereus* sont ubiquitaires et leur présence dans les matières premières alimentaires apparaît comme inévitable.

L'EFSA évoque également d'autres *Bacillus* spp. identifiés comme des causes de dégradation des aliments et d'intoxications alimentaires : *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* (EFSA, 2005; Guinebretiere *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 1992).

L'avis de l'EFSA de 2005 indique que le sol peut contenir entre 10^3 et 10^5 spores de *B. cereus* par gramme (Christiansson *et al.*, 1999; EFSA, 2005; Guinebretiere *et al.*, 2003; Te Giffel *et al.*, 1995). Aussi, il n'est pas surprenant de retrouver ces spores dans les eaux continentales. Différentes espèces de *Bacillus* peuvent être identifiées dans des eaux de surface : *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. mycoïdes*, *B. sphaericus*, *B. circulans*, ainsi que d'autres espèces de *Bacillus* spp. non identifiées (Ostensvik *et al.*, 2004). Baudin *et al.* (2008) ont notamment dénombré entre $1,5$ et $2,5 \cdot 10^2$ spores de bactéries aérobies / mL dans des eaux brutes. D'après les résultats fournis par le laboratoire chargé des analyses dans le cas d'Aire-sur-la-Lys, l'eau de la rivière la Lys contiendrait entre $1,2 \cdot 10^2$ et $2,4 \cdot 10^3$ spores de *Bacillus* spp. / mL.

L'étude de Ostensvik *et al.* (2004) montre également la présence de spores de *Bacillus* spp., notamment *B. cereus*, dans les eaux de distribution, préalablement traitées par filtration et chloration, satisfaisant par ailleurs aux limites de qualité microbiologique d'une EDCH (absence de coliformes et d'*Escherichia coli* dans 100 mL). Dans cette étude, les spores de *Bacillus* spp. sont dénombrées à hauteur de 15 à 140 UFC/100 mL dans les eaux brutes et entre 15 et 38 UFC/100 mL dans les EDCH. Il est ainsi mis en évidence le faible effet de la filtration et de la chloration sur les spores de *Bacillus* spp.. Les auteurs suggèrent que l'eau de boisson traitée par filtration et chloration puisse être à l'origine de contaminations par des spores de *Bacillus* spp. dans les industries alimentaires (Ostensvik *et al.*, 2004).

Dans les rares échantillons d'eaux traitées par l'usine d'Aire-sur-la-Lys qui contenaient des spores de *Bacillus* spp., les concentrations mesurées étaient de 9 à >260 UFC/100 mL. Ces valeurs semblent du même ordre de grandeur que les résultats de dénombrement des spores obtenus par Ostensvik *et al.* (2004) en Norvège ou Francis *et al.* (Francis *et al.*, 2001) en Angleterre (1 à 41 UFC/100 mL).

Dans l'hypothèse où l'EDCH contiendrait ponctuellement des *Bacillus* spp. susceptibles de provoquer des toxi-infections humaines, il est opportun de mettre en perspective les apports potentiels de ces bactéries par l'eau de boisson au regard des autres apports potentiels (aliments). Pour cela, la comparaison des concentrations en *Bacillus* spp. dans les EDCH et celles mesurées dans les autres sources potentielles est pertinente.

Selon les aliments, les valeurs observées sont comprises entre 10 UFC/mL (ou UFC/g) (pour des plats cuisinés réfrigérés) à 10^6 UFC/mL (ou g) (pour des plats cuisinés conservés à 10°C, des herbes aromatiques ou des épices) (EFSA, 2005). La comparaison entre les concentrations de *Bacillus* spp. retrouvées dans les EDCH, que ce soit à Aire-sur-la-Lys ou en Norvège, et de *B. cereus* dans les aliments, permet de constater que ces eaux contiennent de l'ordre de 10^2 à 10^6 fois moins de *Bacillus* que les aliments. En complément, il faut souligner que les *Bacillus* spp. ponctuellement détectés dans l'eau, ne sont pas aussi pathogènes que *B. cereus*, à l'origine de la majorité des intoxications alimentaires provoquées par ce genre bactérien.

Aussi, l'exposition humaine potentielle à des *Bacillus* spp. par ingestion, principale voie d'intoxication pour cette bactérie, via l'eau de boisson, apparaît extrêmement faible au regard de l'exposition potentielle via les autres aliments.

3.4.2. Estimation du risque

Les *Bacillus* spp. peuvent être détectés dans des EDCH distribuées, satisfaisant aux limites ou aux références de qualité microbiologique fixées par la réglementation. Cela est dû à la résistance des spores de *Bacillus* aux processus de désinfection chimique couramment utilisés pour le traitement des EDCH. Dans la littérature, il n'existe pas de données soutenant l'hypothèse selon laquelle les *Bacillus* spp. seraient à l'origine de pathologies hydriques. La mise en œuvre d'une stratégie de gestion spécifique à ces bactéries n'est donc pas requise. Aussi l'OMS ne préconise pas de concentration maximale en *Bacillus* spp. admissible dans les EDCH, ni pour la population générale, ni pour des populations sensibles (OMS, 2011).

Cependant, il est possible d'analyser la situation décrite dans le cas d'Aire-sur-la-Lys. Selon les données fournies par l'ARS, dans les cas où la croissance en aérobiose des colonies atypiques a été constatée après mise en culture d'échantillons d'EDCH prélevée en sortie de la station de reprise de Prêmesques, les concentrations en spores mesurées sont de l'ordre de 0,09 à 2,6 UFC/mL d'eau. Ces concentrations sont très inférieures à la dose infectieuse retenue par l'Afssa⁶ pour *B. cereus* : 10^5 UFC/g d'aliments, *proche de* 10^5 UFC/mL d'eau. En outre, l'eau étant pauvre en nutriments, il n'est pas prouvé que *B. cereus* puisse produire la toxine émétique dans ces conditions (Agata *et al.*, 1999; Rosenfeld *et al.*, 2005).

De même, les pathologies d'origine alimentaire provoquées par *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* ont toujours été associées à de fortes concentrations dans les aliments responsables, de l'ordre de 10^5 cellules ou spores par gramme. Aussi, les risques sanitaires liés à la présence de *B. cereus* ou de *B. licheniformis* dans les EDCH aux concentrations maximales observées dans l'eau traitée par l'usine d'Aire-sur-la-Lys semblent négligeables.

En ce qui concerne les autres espèces de *Bacillus* identifiées dans les eaux d'Aire-sur-la-Lys, aucune dose infectieuse n'est documentée. Aussi, il n'est pas possible de conclure quant au niveau de risque sanitaire qu'implique la présence de ces espèces dans les EDCH pour l'Homme. Cependant, aucun élément ne permet de penser que ces autres espèces représentent un danger en cas de présence dans de l'eau.

Compte tenu du niveau de risque estimé négligeable dans le cas de scénarios d'exposition réalistes, il est nécessaire d'envisager un scénario d'exposition très défavorable, qui maximise l'estimation du risque, pour tester le pire des cas. Dans ce but, l'exercice est réalisé selon l'hypothèse, très peu probable, où une grave défaillance de la filière de traitement conduirait à une injection accidentelle d'eau brute pompée dans la Lys, directement dans le réseau de distribution d'EDCH. D'après les résultats fournis par les laboratoires, chargés des analyses dans le cas d'Aire-sur-la-Lys, les concentrations maximales mesurées dans l'eau de la rivière la Lys sont de $2,4 \cdot 10^3$ spores de *Bacillus* spp./mL. A titre de comparaison, Ostensvik *et al.* (2004), ont mis en évidence, dans des eaux brutes en Norvège, des concentrations en espèces responsables de gastro-entérites, *B. thuringiensis*, *B. cereus* et des souches cytotoxiques de *B. subtilis*, atteignant au maximum 14 spores/mL. Aussi, même en prenant comme deuxième hypothèse, également particulièrement défavorable, que l'intégralité des *Bacillus* présents dans l'eau brute soient des espèces pathogènes pour l'Homme (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou *B. pumilus*), il apparaît que l'eau ne contient pas une concentration en *Bacillus* suffisante pour provoquer habituellement des pathologies humaines par la consommation d'un aliment (10^5 spores de *B. cereus*/mL).

Ainsi, le risque sanitaire lié à la présence de *Bacillus* dans l'eau apparaît extrêmement faible. Il importe de rappeler, que l'eau brute est susceptible de contenir de nombreux micro-organismes autrement plus pathogènes que les *Bacillus*.

⁶ Dans la fiche *Bacillus cereus* de 2009, actuellement en cours de révision, mais sans modification prévue sur ce point.

Les populations sensibles, et particulièrement les « patients à haut risque » tels que définis dans la Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002⁷, doivent être maintenus dans un environnement adapté à leur état. Aussi, des mesures particulières sont nécessaires et doivent être appliquées pour le traitement de l'eau qui leur est fournie, avec notamment des mesures visant à garantir une concentration en bactéries inférieure aux limites de détection de la méthode par culture. Ceci est valable pour toutes les bactéries, notamment les *Bacillus* spp. Les experts considèrent que l'observation rigoureuse de ces précautions sont de nature à limiter le risque liés à la présence dans les EDCH de *Bacillus* spp., y compris les plus pathogènes comme *B. cereus*, pour les populations dites sensibles.

Concrètement, bien que les éventuels cas d'infection à *Bacillus* liés à la consommation d'eau ne fassent pas l'objet d'un recueil d'information spécifique à grande échelle, notons l'absence de cas de ce type recensés à ce jour.

3.5. Conclusions et recommandations

3.5.1. Signification des résultats analytiques

Il ressort du dossier fourni par le pétitionnaire qu'à Aire-sur-la-Lys, quels que soient les milieux utilisés, la lecture des boîtes de culture soumises à une incubation supplémentaire en aérobiose a montré la présence de colonies atypiques translucides qui ne correspondent pas aux caractéristiques des colonies de BASR. Elles ont été identifiées, pour leur grande majorité, comme étant des *B. thermoamylovorans*. Selon la norme NF EN 26461-2, seules les colonies noires doivent être dénombrées en tant que BASR après incubation pendant 48h à 37°C.

Ces colonies ont donc été mises en évidence surtout après incubation complémentaire de 24 à 48 h en condition d'aérobiose, ce qui ne correspond pas au principe de la norme.

Par ailleurs, la présence de *Bacillus* spp. n'est pas exceptionnelle dans l'environnement. Elle est souvent observée lors d'analyse d'eaux, lorsque les usines de production d'EDCH utilisent des eaux de surface.

3.5.2. Risques sanitaires

Les espèces de *Bacillus* mises en évidence dans les eaux produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys sont des bactéries ubiquistes. Certaines de ces espèces sont pathogènes ou pathogènes opportunistes pour l'Homme par voie alimentaire.

Elles devraient être éliminées par les filières de traitements, dans les mêmes proportions que les BASR. Les procédés de traitement installés dans l'usine d'Aire-sur-la-Lys susceptibles d'être efficaces pour réduire les concentrations de spores de bactéries du genre *Bacillus* sont essentiellement la coagulation – floculation, la décantation et la filtration. Les procédés de désinfection mettant en œuvre des oxydants ont peu d'effet sur les formes sporulées.

La quantification du risque lié à la présence des espèces de *Bacillus* dénombrées dans les eaux produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys se heurte à la faiblesse des données disponibles, autant en ce qui concerne l'exposition que les relations doses-réponses. Cependant, il apparaît que :

⁷ Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé : les patients dits « **patients à haut risque** » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours).

- Les pathologies provoquées par des *Bacillus* pathogènes après infection par voie alimentaire, ont à ce jour été observées après consommation d'aliments contenant de fortes concentrations en *Bacillus* pathogènes (de l'ordre de 10^5 spores/g ou mL).
- aucune donnée ne permet de penser que ces fortes concentrations ont pu être atteintes dans des eaux traitées par l'usine d'Aire-sur-la-Lys.

Ainsi, au regard des données fournies, le risque sanitaire lié à la consommation d'eau produite par cette usine et contenant des *Bacillus* spp. apparaît négligeable.

Cependant, d'un point de vue technique, la présence de spores de *Bacillus* spp. dans les eaux produites par cette usine révèle que les micro-organismes présents dans l'eau brute, peuvent, dans certaines conditions (eau brute provenant de la Lys ponctuellement très chargée en micro-organismes, arrêt de certains filtres de l'installation, etc.), ne pas être complètement éliminés par la filière de traitement en place. En fonction de la fréquence du phénomène, cette constatation doit amener le gestionnaire de l'installation à une démarche d'optimisation de la filière de traitement pour limiter la survenue de ces situations. Les informations transmises ne permettent pas de se prononcer sur l'influence d'autres éléments que la filière de traitement sur la présence des *Bacillus* observés dans l'eau traitée : intervention sur le réseau, etc.

3.5.3.Recommandations de gestion

Les éléments fournis dans le dossier montrent que la filière de traitement de l'usine d'Aire-sur-la-Lys n'offrait pas aux dates correspondant aux éléments fournis dans le dossier toutes les garanties d'efficacité vis-à-vis du paramètre « bactéries anaérobies sulfite-réductrices y compris les spores ». Au cas où l'efficacité de la filière n'aurait pas été améliorée, il est indispensable d'en optimiser le fonctionnement.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses adopte les conclusions et recommandations du CES « Eaux ».

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Eau destinée à la consommation humaine, contrôle sanitaire, méthode analytique, microbiologie, *Bacillus*.

BIBLIOGRAPHIE

Agata N, Ohta M, Mori M, Shibayama K (1999) Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiology and Immunology* 43(1), 15-18.

Anses (2010) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'avis sur les mesures de gestion en santé animale et en sécurité sanitaire des aliments lors de suspicions et de confirmations de cas de fièvre charbonneuse. <http://www.anses.fr/Documents/SANT2010sa0007.pdf>

Anses (2011) *Bacillus cereus* - Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments. <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-FicheBacillusCereus.pdf>

Apetroaie-Constantin C, Mikkola R, Andersson MA, Teplova V, Suominen I, Johansson T, Salkinoja-Salonen M (2009) *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *Journal of Applied Microbiology* 106(6), 1976-1985.

Baudin I, Jousset M, Debeaupuis C, Schlumberger C, Dorko J, Debreczeny L, Marchand C, Glucina K Gestion des micro et macroorganismes dans les filtres de filières de production d'eau potable. dans "Les Journées Information Eaux 2008", 2008, Poitiers

Beuchat LR, Pettigrew CA, Tremblay ME, Roselle BJ, Scouten AJ (2005) Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial fruit and vegetable sanitizer to vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32(7), 301-308.

Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B (1999) *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science* 82, 305-314.

Delmas G, Jourdan da Silva N, Pihier N, Weill F-X, Vaillant V, de Valk H (2010) Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 31-32, 344-348.

(2005) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal* 175, 1-48.

(2007) Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. *The EFSA Journal* 587, Appendix B - Assessment of the *Bacillus* species. [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific Opinion/sc_op_ej587_qps_en.3.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific%20Opinion/sc_op_ej587_qps_en.3.pdf?ssbinary=true)

(2008) The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal* 923, 1-48. [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific Opinion/biohaz_op_ej923_qps_en.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific%20Opinion/biohaz_op_ej923_qps_en.pdf?ssbinary=true)

EFSA (2009) Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). *EFSA Journal* 7(12), 1431.

EFSA (2010) Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2010 update). *EFSA Journal* 8(12), 1944.

EFSA (2011) Technical Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. 9(11), 2445 (13pp). www.efsa.europa.eu/efsajournal

Fasanella A, Galante D, Garofolo G, Jones MH (2010) Anthrax undervalued zoonosis. *Veterinary Microbiology* 140(3-4), 318-331.

Francis CA, Lockley AC, Sartory DP, Watkins J (2001) A simple modified membrane filtration medium for the enumeration of aerobic spore-bearing bacilli in water. *Water Research* 35(15), 3758-3761.

From C, Hormazabal V, Granum PE (2007) Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology* 115(3), 319-324.

From C, Pukall R, Schumann P, Hormazabal V, Granum PE (2005) Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3), 1178-1183.

Guinebretiere MH, Girardin H, Dargaignaratz C, Carlin F, Nguyen-The C (2003) Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. *International Journal of Food Microbiology* 82(3), 223-232.

Hendriksen NB, Hansen BM (2002) Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Canadian Journal of Microbiology* 48(3), 256-261.

Ichimatsu T, Mizuki E, Nishimura K, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Ohba M (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Current Microbiology* 40(4), 217-220.

Invs (2011) Maladies à déclaration obligatoires- Toxi-infections alimentaires collectives (Tiac). Données épidémiologiques. Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2009. *Dossiers Thématiques*. <http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/default.htm>

Kramer JM, Gilbert RJ (1989) 'Bacillus cereus and other Bacillus species.' 0-8247-7866-9,

Logan NA, De Vos P (2009a) Genus I. Bacillus. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. (Eds P De Vos, GM Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer and WB Whitman) pp. 21-128. (Springer: Dordrecht)

Logan NA, De Vos P (2009b) Genus IV. Brevibacillus. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. (Eds P De Vos, GM Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer and WB Whitman) pp. 305-316. (Springer: Dordrecht)

Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM (1999) Relationship of Bacillus subtilis clades associated with strains 168 and W23: a proposal for Bacillus subtilis subsp subtilis subsp nov and Bacillus subtilis subsp spizizenii subsp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1211-1215.

OMS (2011) Guidelines for drinking-water quality, fourth edition. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/

Ostensvik O, From C, Heidenreich B, O'Sullivan K, Granum PE (2004) Cytotoxic Bacillus spp. belonging to the B-cereus and B-subtilis groups in Norwegian surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 96(5), 987-993.

Priest FG (2009) Genus I. Paenibacillus. Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. (Eds P De Vos, GM Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer and WB Whitman) pp. 291-295. (Springer: Dordrecht)

Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, Berkeley RCW (1987) *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37(1), 69-71.

Rice EW, K.R. F, R.J. M, A. LD, C.H. J (1996) Evaluation plant performances with endospores. Monitoring for indigenous spores of aerobic spore-forming bacteria proves a viable method of assessing treatment plant performance. *Journal American Waterworks Association* 88(9), 122-130.

Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM (1996) Bacillus vallismortis sp nov, a close relative of Bacillus subtilis, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(2), 470-475.

Rodriguez JH, Cousin MA, Nelson PE (1992) Evaluation of anaerobic growth of Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis in tomato juice. *Journal of Food Protection* 55, 672-677.

Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P (2005) Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen Bacillus cereus F4430/73 strain. *Canadian Journal of Microbiology* 51(2), 149-158.

Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kampfer P, Andersson MC, Honkanen-Buzalski T, Scoging AC (1999) Toxigenic strains of Bacillus licheniformis related to food poisoning. *Applied & Environmental Microbiology* 65(10), 4637-4645.

Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE (2008) From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Reviews* 32(4), 579-606.

Te Giffel MC, Beumer RP, Slaghuis BA, Rombouts FM (1995) Occurrence and characterization of psychrotrophic Bacillus cereus on farms in the Netherlands. *Netherlands Milk & Dairy Journal* 49(125-138).

Valentino L, Torregrossa MV (1995) Risk of Bacillus cereus and Pseudomonas aeruginosa nosocomial infections in a burns center - The microbiological monitoring of water-supplies for a preventive strategy. . *Water Science and Technology* 31(5-6), 37-40.

Bacillus spp dans l'eau

Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* spp dans l'eau destinée à la consommation humaine délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas-de-Calais)

Saisine : 2011-SA-0147

Rapport

Septembre 2012

Mots-clés

Bacillus spp, eau destinée à la consommation humaine, usine de production d'eau, Aire-sur-la-Lys

Présentation des intervenants

CONTRIBUTEURS SCIENTIFIQUES

Coordination scientifique

M. Rémi POIRIER – Direction de l'évaluation des risques – Unité d'évaluation des risques liés à l'eau

Rapporteurs du CES « Eaux »

Mme Bénédicte WELTE - Eau de Paris

M. Pierre LE CANN – École des hautes études en santé publique (EHESP)

M. Christophe NGUYEN-THE – Institut national de recherche agronomique (INRA) Avignon

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Résumé	5
Sigles et abréviations	7
Définitions	7
Introduction	8
1 Description du danger lié aux <i>Bacillus</i> spp et aux genres apparentés	10
1.1 Généralités	10
1.2 Espèces responsables de maladies chez l'Homme après ingestion	11
1.2.1 Les espèces de <i>Bacillus</i> spp à l'origine de gastro-entérites	11
1.2.2 Mécanismes des gastro-entérites causées par <i>Bacillus</i> spp	11
1.2.3 Notions de doses réponse dans le cas des gastro-entérites causées par <i>Bacillus</i> spp	12
1.2.4 Sources des gastro-entérites causées par <i>Bacillus</i> spp.....	12
1.2.5 Présence de <i>Bacillus</i> spp dans l'eau.....	13
1.3 <i>Bacillus</i> spp responsables de maladies chez l'Homme autres que des gastro-entérites	14
1.4 Données existantes concernant l'innocuité des espèces de <i>Bacillus</i> présumés non dangereux identifiées dans l'eau de l'usine d'Aire-sur-la-Lys	14
2 Métrologie des <i>Bacillus</i> spp	16
2.1 Méthode de recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs	16
2.1.1 Principe de la méthode de recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (<i>clostridia</i>) ; Partie 2 - filtration sur membrane : Norme NF EN 26461-2, juillet 1993.....	16
2.1.2 Protocole de la Norme NF EN 26461-2, juillet 1993	16
2.1.3 Protocole réalisé par le laboratoire LMCU, Veilles sanitaire et écologique (VSE).....	16
2.1.4 Protocole réalisé par la Société des eaux du nord (SEN)	16
2.1.5 Protocole utilisé par l'IPL	17
2.2 Résultats.....	17
2.2.1 Résultats du laboratoire LMCU/VSE	17
2.2.2 Résultats du laboratoire des eaux du Nord	17
2.2.3 Résultats de l'IPL.....	18
2.2.4 Informations complémentaires	18
2.3 Discussion	18
3 La filière de traitement de l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas-de-Calais) ...	20
3.1 Contexte	20
3.2 La filière de traitement	20
3.3 Amélioration de la filière prévue	21
3.4 Analyses de surveillance.....	21
3.5 Analyse critique de la filière de traitement et de son fonctionnement.....	25
3.5.1 Filière	25
3.5.2 Connaissances bibliographiques et aspect critique	25
3.6 Conclusion sur la filière de traitement et son fonctionnement	27
4 Évaluation du risque.	29
4.1 Exposition	29
4.2 Estimation du risque	31
5 Conclusions et recommandations.....	33
5.1 Signification des résultats analytiques	33
5.2 Risques sanitaires	33
5.3 Recommandations de gestion	34
Références bibliographiques	35
Annexe 1 : Courrier de saisine de l'Anses	41
Annexe 2 : Constitution du dossier technique reçu.....	42
Annexe 3 : Démarche QPS de l'EFSA et espèces de <i>Bacillus</i> inscrites sur la liste QPS.....	43
Annexe 4 : Schéma de principe de la filière de traitement d'Aire-sur-la-Lys	46
Annexe 5 : Précisions concernant <i>Bacillus anthracis</i>	47
Annexe 6 : Exemples d'incidences de <i>B. cereus</i> dans différents aliments (EFSA 2005)	50

Résumé

Lors d'analyses réalisées dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas-de-Calais), alors que l'ensemble des résultats relatifs aux paramètres microbiologiques suivis au titre du Code de la santé publique ou de la surveillance des producteurs d'EDCH étaient conformes, des « colonies translucides atypiques » ont été observées sur un milieu de culture utilisé pour la recherche des micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs. Selon la norme d'analyse NF EN 26461-2 relative au dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs, ces colonies n'auraient pas dû être prises en compte, car ne correspondant pas aux colonies caractéristiques telles que décrites dans la norme. L'identification des bactéries correspondant aux colonies atypiques a mis en évidence la présence de plusieurs espèces de *Bacillus* (*B. thermoamylovorans*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. vireti*, *B. borstelensis*, *B. fucosivorans*, et *Paenebacillus* spp.) dans les eaux traitées. Par ailleurs, des *B. cereus* ont été identifiés dans l'eau brute provenant de la Lys.

Pour répondre à une demande de la Direction générale de la santé (DGS), l'Anses a mené une expertise portant sur les risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* dans l'EDCH délivrée par l'usine d'Aire-sur-la-Lys.

Certaines espèces de *Bacillus* sont connues pour être responsables de cas de gastro-entérites d'origine alimentaire chez l'Homme, *B. cereus* étant l'espèce décrite comme responsable de la plupart de ces cas. D'autres espèces sont également connues comme étant à l'origine de gastro-entérites : *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*. Les toxi-infections ou intoxications attribuées à des *Bacillus* sont majoritairement associées à la consommation de certains aliments : riz, pâtes, légumes, etc. L'eau de boisson n'est pas identifiée comme une source d'infection par ce genre bactérien.

Les sols constituant l'habitat privilégié de ce genre ubiquitaire, il apparaît inévitable de les retrouver dans les matières premières alimentaires et les eaux. Les bonnes pratiques d'hygiène et la bonne conception des équipements de production sont essentielles pour en maîtriser la contamination. Ces bactéries peuvent être présentes dans des eaux de boisson, y compris celles satisfaisant aux limites de qualité microbiologiques d'une EDCH. L'OMS ne préconise pas le suivi des *Bacillus* dans les EDCH étant donné l'absence de résultats d'étude les impliquant dans des pathologies hydriques.

Concernant l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys, l'étape de filtration de la filière de traitement ne semble pas avoir un fonctionnement optimal pour la rétention des spores et formes végétatives des bactéries anaérobies sulfito-réductrices. Cependant, il est difficile d'en appréhender complètement les raisons au regard des éléments disponibles dans le dossier. Aucune indication n'est donnée sur les interventions éventuelles (événements d'exploitation, travaux,...) ayant eu lieu avant l'observation des *Bacillus*.

Selon les données fournies par l'Agence régionale de santé (ARS), les concentrations en bactéries atypiques retrouvées dans l'EDCH d'Aire-sur-la-Lys (0,09 à 2,6 UFC / mL d'eau) sont très inférieures à la dose infectieuse retenue pour *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* dans les aliments (10^5 UFC / mL). En outre l'eau étant pauvre en nutriments, il n'est pas prouvé que *B. cereus* puisse produire la toxine émétique dans de telles conditions. Aussi, le risque sanitaire lié à la présence de *Bacillus* pathogènes aux concentrations maximales observées dans l'eau traitée par l'usine d'Aire-sur-la-Lys semble négligeable.

Dans l'hypothèse très peu probable où une défaillance de la filière de traitement devait conduire à une injection accidentelle d'eau brute pompée dans la Lys directement dans le réseau de distribution, les concentrations maximales mesurées dans l'eau de cette rivière ($2,4 \cdot 10^3$ spores de *Bacillus* spp / mL) restent encore très inférieures aux doses infectieuses

retenues pour les *Bacillus* pathogènes. Là aussi, le risque sanitaire lié à la présence de *Bacillus* dans l'eau apparaît extrêmement faible.

Sigles et abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
Afssa :	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Anses :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARS :	Agence régionale de santé
CAE :	Centre d'analyses environnementales
CAG :	Charbon actif en grain
CES :	Comité d'experts spécialisé
CSHPF :	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
DGAI :	Direction Générale de l'Alimentation
DGCCRF :	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DGS :	Direction générale de la santé
DREAL :	Direction régionale de l'environnement, de l'aménagement et du logement
EDCH :	Eau destinée à la consommation humaine
EFSA :	Autorité européenne de sécurité des aliments / <i>European Food Safety Authority</i>
ERS :	Évaluation des risques sanitaires
IPL :	Institut Pasteur de Lille
LMCU :	Lille métropole communauté urbaine
OMS / WHO :	Organisation mondiale de la santé / <i>World Health Organization</i>
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
QPS :	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
SEN :	Société des eaux du nord
SMAEL :	Syndicat mixte d'adduction des eaux de la Lys
TCS :	Tryptone, Caséine, Soja
UE :	Union européenne
UFC :	Unité formant colonie
VSE :	Veilles sanitaire et écologique

Définitions

CT : correspond au produit du temps de contact entre le désinfectant et le micro-organisme et de la concentration de désinfectant, exprimé en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$, nécessaire pour désinfecter spécifiquement un micro-organisme cible.

Colonies atypiques :

désignent dans ce rapport toutes celles ne correspondant pas aux caractéristiques des colonies à prendre en compte selon la norme NF EN 26461-2 relative au dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*clostridia*) : « Compter toutes les colonies noires après incubation pendant 20 +/- 4h et 44 +/- 4h. »

Clostridia : selon la norme NF EN 26461-2, ce terme désigne les « micro-organismes anaérobies formant des spores et sulfito-réducteurs, appartenant à la famille des Bacillacées et au genre *Clostridium*. »

Introduction

Contexte

Dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), la réglementation prévoit la recherche de bactéries sulfito-réductrices y compris les spores sur les points de mise en distribution (entrée de l'eau traitée dans le réseau de distribution) et en distribution (au robinet du consommateur). La norme NF EN 26461-2 « Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*) » prévoit le dénombrement des colonies caractéristiques de couleur noire des bactéries recherchées, dans des conditions opératoires bien définies. La norme n'évoque pas le dénombrement ou l'identification des colonies atypiques.

Le suivi hebdomadaire, effectué par le laboratoire de veilles sanitaire et écologique de Lille métropole communauté urbaine (LMCU), des EDCH produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys a mis en évidence la présence de colonies atypiques lors de la recherche et du dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*). Cette constatation a été faite à partir du mois d'août 2010, sans constater de non-conformité pour les paramètres microbiologiques réglementaires prévus par l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des EDCH mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique. Le LMCU a décidé de faire identifier les colonies atypiques observées.

Le laboratoire de l'Institut Pasteur de Lille (IPL), chargé de l'identification des bactéries correspondant aux colonies atypiques observées lors des analyses d'eau traitée, a identifié *B. thermoamylovorans*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. vireti*, *B. borstelensis*, *B. fucosivorans*, *Roseomonas genomospecies*, *Staphylococcus epidermidis* et *Paenebacillus* spp.,

Le laboratoire de l'IPL, a également identifié des *B. cereus* dans deux prélèvements d'eau brute provenant de la Lys.

La présence de *Bacillus cereus* dans certains aliments est connue pour provoquer des symptômes diarrhéiques et émétiques (Anses, 2011).

Les *Bacillus* spp ne font pas partie des paramètres de qualité microbiologique réglementaires des EDCH.

Objet de la saisine

L'expertise porte sur les risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* dans l'EDCH délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys.

La DGS a transmis à l'Anses une note qui précise les éléments attendus par l'Agence régionale de santé (ARS) du Nord-Pas de Calais à l'origine de la saisine. La dernière de ces questions portant sur « la conduite à tenir en cas de découverte de toute autre bactérie non recherchée habituellement dans l'eau » ne peut trouver de réponse générale. Chaque situation doit être étudiée au cas par cas, en fonction du contexte et des bactéries mises en cause. La question ne sera donc pas traitée dans le cadre de cette expertise.

L'évaluation des risques sanitaires portera tout particulièrement sur les *Bacillus* identifiés dans l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys, vis-à-vis de la population générale et de la ou les populations sensibles le cas échéant. Elle prendra en compte les usages alimentaires de l'eau. Les performances de la filière de traitement mise en œuvre à l'usine d'Aire-sur-la-Lys seront examinées notamment au regard de *Bacillus*.

Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

Les questions posées par l'ARS ont été examinées avec le bureau de l'eau de la DGS après transmission de la saisine. Sur la base du cadrage de la saisine, la modalité de travail retenue est la nomination de rapporteurs rattachés au Comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ».

Le présent rapport, a été soumis au CES « Eaux » pour discussion et adoption les 5 juillet et 6 septembre 2012.

1 Description du danger lié aux *Bacillus* spp et aux genres apparentés

1.1 Généralités

Les *Bacillus* spp (4 à 10 µm) sont des bactéries Gram positifs, aérobies stricts ou anaérobies facultatives, rattachées à la famille des *Bacillaceae*. Elles ont une importante capacité à produire des spores très résistantes à des conditions environnementales défavorables (Logan et De Vos, 2009a). Les spores de nombreuses espèces de *Bacillus* spp (notamment *B. cereus*) sont abondantes dans le sol (Guinebretiere *et al.*, 2003; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Parmi les *Bacillus* spp isolés des eaux non traitées d'Aire-sur-la-Lys, le groupe *B. cereus* ressemble plusieurs espèces génétiquement très proches, définies empiriquement sur des critères phénotypiques (*B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus* au sens strict; *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*).

Même s'il est génétiquement et taxonomiquement très proche de *B. cereus* au sens strict, *B. anthracis* a une écologie totalement différente et sa présence dans l'environnement est liée à l'existence d'infection chez les animaux (Fasanella *et al.*, 2010). La présence de spores de *B. cereus* ne préjuge pas de la présence de spores de *B. anthracis*.

Bacillus licheniformis et *Bacillus subtilis* sont des causes fréquentes d'altération des aliments ayant reçu un traitement thermique. Toutes deux sont anaérobies facultatives. *Bacillus licheniformis* est phylogénétiquement très proche de *Bacillus subtilis*. (Logan et De Vos, 2009a).

B. circulans est phylogénétiquement très proche de *Bacillus lentus* et *Bacillus firmus*. L'espèce *Bacillus thermoamylovorans* est peu connue et n'a été décrite qu'à partir d'un seul isolat. *B. vireti*, a été isolé de prairies et décrit avec un ensemble d'autres espèces très proches telles que *B. novalis*, *B. bataviensis*, *B. drentensis*. L'espèce *Bacillus circulans* a longtemps regroupé des bactéries très différentes, dont beaucoup sont désormais classées dans le genre *Paenibacillus*. Ce changement de classification peut être source de mauvaise identification d'isolats (Logan et De Vos, 2009a).

Les *Paenibacillus* spp et *Brevibacillus* spp sont des bacilles Gram positifs, producteurs d'endospores, anaérobies facultatifs ou aérobies stricts. Ils faisaient partie du genre *Bacillus* spp jusqu'à ce que l'étude de leur phylogénie les fasse ressortir comme des genres distincts (Logan et De Vos, 2009a; Priest, 2009). Les deux genres *Paenibacillus* et *Brevibacillus* font partie de la famille des *Paenibacillaceae*. *Brevibacillus borstelensis* a été décrite en 1995 à l'origine comme *Bacillus borstelensis* à partir de souches divergentes de l'espèce *Bacillus brevis*, puis rattaché au genre des *Brevibacillus*. Les souches ayant servi à décrire l'espèce proviennent du sol (Logan et De Vos, 2009b).

Les spores de *Bacillus* spp et genres apparentés sont résistantes aux désinfectants. A titre d'exemple des spores de *B. cereus* exposées à 200 mg/L d'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes¹ subissent une réduction d'environ 2 log₁₀ de leur concentration (Beuchat *et al.*, 2005).

¹ Ce couple temps de contact / concentration est très nettement supérieur à celui utilisé en désinfection d'EDCH (1 à 3 mg/L pendant 30 minutes).

1.2 Espèces responsables de maladies chez l'Homme après ingestion

L'ensemble des *Bacillus* spp sont abordés dans le présent chapitre, même si *B. cereus*, espèce qui fait l'objet de nombreuses publications, est plus particulièrement décrite.

1.2.1 Les espèces de *Bacillus* spp à l'origine de gastro-entérites

Plusieurs espèces de *Bacillus* spp ont été à l'origine de gastro-entérites et seront brièvement présentées dans ce paragraphe, même si elles ne correspondent pas aux espèces retrouvées dans les échantillons d'eau traitée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys.

La plupart des gastro-entérites provoquées par les *Bacillus*, sont causées par *Bacillus cereus* et des espèces très proches comme *B. thuringiensis* (EFSA, 2005). *B. cereus* au sens large (incluant *B. thuringiensis*) représente la 4^{ème} cause de toxi-infections alimentaires en France (Delmas *et al.*, 2010; Invs, 2011). D'autres espèces de *Bacillus* sont également à l'origine de gastro-entérites d'origine alimentaire, bien que beaucoup plus rarement. Il s'agit de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*, (Apetroaie-Constantin *et al.*, 2009; EFSA, 2005; From *et al.*, 2007; From *et al.*, 2005; Kramer et Gilbert, 1989; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999).

B. pumilus et *B. licheniformis* sont phylogénétiquement proches de *B. subtilis* (Logan et De Vos, 2009a). *B. mojavensis* a été défini à partir de souches de *B. subtilis* particulières (Roberts *et al.*, 1994). Aussi, en raison de leur proximité et de leur faible discrimination en termes d'identifications vis-à-vis de *B. subtilis*, il ne peut être exclu que d'autres espèces et sous-espèces très proches de *B. subtilis*, comme *B. amyloliquefaciens* (Priest *et al.*, 1987), *B. atrophaeus* (Nakamura, 1989), *B. vallismortis* (Roberts *et al.*, 1996), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (Nakamura *et al.*, 1999) et *B. subtilis* subsp. *subtilis*, puissent aussi causer des gastroentérites.

Jusqu'à présent, aucune autre espèce du genre *Bacillus* ou d'autres genres apparentés n'ont été identifiés comme cause de gastro-entérite (Logan et De Vos, 2009a).

1.2.2 Mécanismes des gastro-entérites causées par *Bacillus* spp

Les gastro-entérites causées par *B. cereus* et les *Bacillus* spp sont généralement bénignes, avec néanmoins de très rares cas mortels (EFSA, 2005). Elles résultent de deux mécanismes différents.

- Des toxi-infections dans le cas des syndromes diarrhéiques causés par *B. cereus*. Les cellules libres ou issues de spores ingérées se multiplient dans l'intestin où elles produisent des entérotoxines lysant les cellules de l'épithélium intestinal. La durée moyenne d'incubation est de 8 à 16 heures. Les principaux symptômes sont des diarrhées aqueuses, des douleurs abdominales, des nausées, durant généralement 24 heures (Anses, 2011; EFSA, 2005; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).
- Des intoxications dans le cas des syndromes émétiques causés par *B. cereus*. La bactérie produit lors de sa croissance dans l'aliment un peptide toxique, la céréulide, très stable à la chaleur et aux pH extrêmes. L'ingestion de la toxine, même en l'absence de cellules bactériennes, produit les symptômes de gastro-entérites (EFSA, 2011). Les symptômes, nausées, vomissements, malaises, parfois accompagnés de diarrhées et douleurs abdominales, surviennent dans les 30 minutes à 6 heures après ingestion de la toxine (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Bien que moins bien connu, le mécanisme conduisant aux gastroentérites causées par les autres espèces de *Bacillus* semble être aussi une intoxication provoquée par des lipopeptides (EFSA, 2011), avec des durées d'incubation et des symptômes similaires à ceux

induits par la toxine émétique de *B. cereus* (Kramer et Gilbert, 1989).

1.2.3 Notions de doses réponse dans le cas des gastro-entérites causées par *Bacillus* spp

Pour certaines espèces du genre *Bacillus*, les quantités de bactéries ou de spores susceptibles de provoquer le développement de pathologies peuvent être estimées, pour des voies d'exposition et des populations bien définies.

Dans le cas des toxi-infections diarrhéiques, la quantité de cellules ou spores de *B. cereus* pathogènes retrouvée dans les aliments incriminés est généralement égale ou supérieure à 10^5 par gramme ou millilitre et dans de très rares cas égale ou supérieure à 10^3 par gramme ou millilitre (EFSA, 2005; Kramer et Gilbert, 1989; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Dans le cas des intoxications émétiques, les toxines peptidiques sont très stables et peuvent persister dans l'aliment même si les bactéries ont disparu. Néanmoins, elles ne sont produites qu'en fin de phase de croissance de *Bacillus cereus* (EFSA, 2005). Un minimum de 10^5 cellules de *Bacillus cereus* par gramme ou millilitre de l'aliment à un stade de sa production est nécessaire.

De même, les pathologies d'origine alimentaire provoquées par *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, ont toujours été associées à une population importante de ces bactéries dans les aliments responsables, de l'ordre de 10^5 cellules ou spores par gramme (Kramer et Gilbert, 1989).

Compte tenu des quantités de spores ou cellules de *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou *B. pumilus* présentes dans les matières premières alimentaires, il est admis qu'une phase de multiplication dans l'aliment avant sa consommation est nécessaire pour conduire à une gastro-entérite (EFSA, 2005).

La multiplication de *B. cereus* et la production de toxine émétique nécessitent la disponibilité d'acides aminés (Agata *et al.*, 1999; Glatz et Goepfert, 1976; Glatz et Goepfert, 1977). Pour les autres *Bacillus* pathogènes les conditions nécessaires à la toxinogénèse ne sont pas connues, mais il est peu probable que cette dernière puisse se produire dans de l'eau de boisson.

1.2.4 Sources des gastro-entérites causées par *Bacillus* spp

Les aliments l'unique source identifiée dans la littérature à l'origine de toxi-infections et intoxications à *Bacillus* (Anses, 2011; EFSA, 2005).

Les spores de *B. cereus* sont présentes dans quasiment toutes les catégories d'aliments. Des produits secs ou déshydratés, tels que les épices, les herbes aromatiques, certains légumes, les céréales et les farines, sont fréquemment contaminés à des niveaux variables par *B. cereus*. Ces matières premières rentrant dans la composition d'un produit fini, sont des sources potentielles de contamination. Par ailleurs, les spores de *B. cereus* possèdent de fortes capacités d'adhésion aux surfaces en acier inoxydable et peuvent s'accumuler dans les équipements de transformation qui peuvent alors devenir des réservoirs de spores. Les risques pour le consommateur sont le plus souvent liés à une multiplication de *B. cereus* lors de l'exposition des aliments à des températures inappropriées. Les aliments associés à des toxi-infections à *B. cereus* sont fréquemment, mais non exclusivement, traités thermiquement et/ou ne sont pas refroidis de manière adéquate après leur préparation et avant la consommation. Plusieurs intoxications avec symptômes émétiques ont été causées par des produits amylicés (plats à base de riz ou de pâtes). Sans être exhaustif, les plats cuisinés, les produits agrémentés d'épices, d'herbes ou aromates, les aliments déshydratés reconstitués par addition d'eau chaude (potages en poudre, purées de pommes de terre préparées à partir de flocons, lait en poudre, etc.) ou cuits à l'eau (pâtes, riz, semoule) conservés à une température permettant la croissance de *B. cereus*, comprises entre 4°C et

55°C, et avec une consommation différée, figurent parmi les aliments à redouter, dans le cas de *B. cereus* (EFSA, 2005; Kramer et Gilbert, 1989).

La croissance de *B. cereus* (Rosenfeld *et al.*, 2005), et la production de toxines dans le cas d'intoxications émétiques (Agata *et al.*, 1999), nécessitent des milieux riches en acides aminés. Ces conditions ne sont pas réunies dans une matrice telle que l'eau de boisson.

Aucune toxi-infection ni intoxication à *Bacillus* spp n'a été identifiée dans la littérature comme associée à la consommation d'eau de boisson.

1.2.5 Présence de *Bacillus* spp dans l'eau

Les spores de nombreuses espèces de *Bacillus* spp (notamment *B. cereus*) sont abondantes dans le sol (Guinebretiere *et al.*, 2003; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Il est donc probable qu'une fraction soit entraînée vers les eaux de surface. Il est probable que ce phénomène soit amplifié en cas de fortes précipitations et que les *Bacillus* spp se retrouvent alors en abondance dans les eaux de surface. Baudin *et al.* dans leur étude portant sur une quinzaine de filtres, équipant différentes filières de traitement, ont dénombré de 150 à $2 \cdot 10^4$ /100 mL de bactéries aérobies sporulées dans les eaux brutes (Baudin *et al.*, 2008).

Rice *et al.* (1996) ont rapporté des dénombrements de spores aérobies (*Bacillus* spp) dans des eaux de surface allant de 200 à 23 000 UFC/100 mL alors que les dénombrements dans les eaux souterraines variaient de <1 à 12 UFC/100 mL (Rice *et al.*, 1996). La saisonnalité de la présence de *Bacillus* spp dans les eaux n'a pas été spécifiquement étudiée. Cependant, dans l'environnement ce genre de bactéries est majoritairement présent sous forme sporulée, très stable et peut résister plusieurs années (Hendriksen et Hansen, 2002). Aussi, il est probable que leur population évolue peu d'une saison à l'autre.

Parmi les espèces susceptibles de causer des gastro-entérites, *B. thuringiensis*, *B. cereus* et des souches cytotoxiques de *B. subtilis* ont été décrites dans les eaux de surface au Japon et en Norvège (Ichimatsu *et al.*, 2000; Ostensvik *et al.*, 2004), avec des concentrations comprises entre 15 et 140 UFC/100mL. Ostensvik *et al.* (2004) remarquent que les procédés de traitement de l'eau mis en œuvre dans les filières étudiées (chloration et filtration) n'éliminent pas complètement les spores de *Bacillus*. Les échantillons d'eau du robinet révèlent la présence de spores à des concentrations comprises entre 15 et 38 UFC/100mL.

Bacillus rigui, une espèce proche de *B. solisalsi*, *B. barbaricus*, *B. macauensis*, *B. arsenicus* et *B. gelatini*, a été décrite dans les eaux de surface en Corée du sud (Baik *et al.*, 2010) et *B. macauensis* dans les eaux brutes en entrée d'une usine de production d'eau potable en Chine (Zhang *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les *Bacillus* spp et genres apparentés peuvent être identifiés dans de l'eau de boisson distribuée en réseau, alimenté par des filières de traitement mettant en œuvre des procédés de désinfection conformes aux standards actuels (OMS, 2011). Ils ne sont cependant pas spécifiquement recherchés et dénombrés, et sont généralement identifiés après ensemencement des milieux de culture utilisés pour le dénombrement d'*Escherichia coli*. Le genre *Paenibacillus* est souvent identifié dans ces conditions.

Enfin, en France, en cas de suspicion de contaminations intentionnelles *B. anthracis* peut également être recherché dans les eaux destinées à la consommation humaine. La technique utilisée pour cela est la Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative.

1.3 *Bacillus* spp responsables de maladies chez l'Homme autres que des gastro-entérites

Très largement répandus dans la nature, *Bacillus cereus* et d'autres *Bacillus* spp sont également responsables d'infections opportunistes chez des patients souffrant de pathologies graves ou lors de contaminations de champs opératoires. L'ingestion de spores ou de bactéries ne semble pas être la source de ces infections (EFSA, 2007; EFSA, 2008), cependant la présence de *B. cereus* dans l'eau a été proposée comme hypothèse de source de contamination dans des cas très particuliers comme les unités de soins des grands brûlés (Valentino et Torregrossa, 1995).

Chez l'Homme on note principalement des infections oculaires (parfois extrêmement graves), des infections respiratoires, des infections du système nerveux central, des bactériémies, des septicémies, des endocardites et exceptionnellement des péricardites, des abcès et des gangrènes nécrotiques entraînant parfois l'amputation, des ostéomyélites, des surinfections des plaies, des arthrites et des infections des prothèses articulaires, des infections génitales chez la femme (Bottone, 2010).

B. anthracis est à l'origine de la maladie du charbon chez l'Homme et les animaux, et peut provoquer la mort après ingestion en l'absence d'un traitement adapté (OMS, 2011). L'infection peut être contractée par voie respiratoire, cutanée, mais aussi par ingestion d'aliments (Fasanella *et al.*, 2010).

En France, la fièvre charbonneuse des mammifères de toutes les espèces est une maladie réputée contagieuse qui donne lieu à déclaration et à l'application de mesures sanitaires (Décret n° 65-697 du 16 août 1965). Cependant la maladie du charbon n'a plus une incidence majeure dans les pays occidentaux même si quelques foyers sont susceptibles d'apparaître occasionnellement (Fasanella *et al.*, 2010)

Selon l'avis de l'Anses relatif aux mesures de gestion lors de suspicions de cas de fièvre charbonneuse, « l'apparition d'un foyer peut être due à :

- un phénomène « naturel »
 - o réémergence des spores sur la parcelle où le foyer s'est déclaré ;
 - o apport de matériel contaminé par des spores mais non issu d'un foyer (phénomène hydrologique, fourrage ou aliment du commerce contaminé, apport de terre contaminée, etc.).
- un lien épidémiologique avec un foyer non identifié ... : déplacement/achat d'animaux en incubation ou malades, prêt de matériel souillé, achat d'aliments contaminés, etc. » (Anses, 2010).

L'annexe 5 apporte des précisions sur *Bacillus anthracis*. Dans le contexte d'Aire-sur-la-Lys, rien ne semble justifier des investigations particulières vis-à-vis de cette espèce.

1.4 Données existantes concernant l'innocuité des espèces de *Bacillus* présumés non dangereux identifiées dans l'eau de l'usine d'Aire-sur-la-Lys

B. licheniformis, *B. coagulans*, avec une qualification « absence de production de toxine » (c'est-à-dire en excluant les rares souches produisant des toxines pouvant conduire à des gastro-entérites), font partie de la liste QPS (Qualified Presumption of Safety) tenue à jour par l'EFSA (European Food Safety Authority). Le principe de cette liste est d'identifier les groupes de micro-organismes, généralement au niveau de l'espèce, ne suscitant pas d'inquiétude en matière de sécurité ou pour lesquels toutes les préoccupations sanitaires éventuelles ont pu être écartées, en vue de leur utilisation dans la chaîne de production des aliments. Ainsi, lorsqu'un agent biologique de cette liste est notifié à l'EFSA pour utilisation particulière, il n'est plus nécessaire de procéder à l'évaluation complète de son innocuité,

déjà considérée comme suffisante (EFSA, 2007; EFSA, 2008; EFSA, 2009; EFSA, 2010). Par contre, les espèces non inscrites sur la liste après évaluation peuvent avoir été écartées en raison de l'existence de dangers (par exemple production de toxine), mais le plus souvent au motif d'un manque de connaissances disponibles permettant d'étayer l'innocuité de l'espèce. Le détail de cette approche et les argumentaires relatifs à l'introduction de *Bacillus* spp sur cette liste est synthétisé en annexe 3.

B. circulans n'est pas inscrit sur cette liste car certaines souches de cette espèce suscitent des inquiétudes en termes de sécurité sanitaire (production d'antibiotiques, signalement d'infection humaine, production potentielle de toxines) et car les connaissances actuelles sur son utilisation dans la chaîne alimentaire ne sont pas suffisantes. Cela n'exclut pas l'introduction ultérieure de *B. circulans* sur la liste QPS si l'évolution des connaissances permet de prouver son innocuité dans le cadre d'une notification à l'EFSA pour une utilisation particulière (EFSA, 2010).

B. thermoamylovorans, *B. vireti*, *B. borstelensis*, *B. fucosivorans*, n'ont pas fait l'objet d'une appréciation de leur innocuité dans l'approche QPS. Parmi les nombreuses espèces de *Paenebacillus* spp, seule *P. macerans* a été évaluée selon l'approche QPS, et n'a pas été ajoutée à la liste par manque de connaissances.

2 Métrologie des *Bacillus* spp

Le suivi hebdomadaire, par le laboratoire de Veille sanitaire de Lille métropole communauté urbaine (LMCU), des EDCH produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys a mis en évidence la présence de bactéries atypiques lors de la recherche et du dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (*Clostridia*). Cette constatation a été faite à partir du mois d'août 2010, sans qu'il n'y ait de nonconformité sur les paramètres réglementaires microbiologiques prévus par l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique.

2.1 Méthode de recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs

2.1.1 Principe de la méthode de recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (*clostridia*) ; Partie 2 - filtration sur membrane : Norme NF EN 26461-2, juillet 1993

Selon la norme NF EN 26461-2, le terme *Clostridia* désigne les « micro-organismes anaérobies formant des spores et sulfite-réducteurs, appartenant à la famille des Bacillacées et au genre *Clostridium*. »

La méthode consiste à sélectionner les spores de micro-organismes sulfite-réducteurs dans un échantillon d'eau, par chauffage pour détruire les formes végétatives. L'échantillon est ensuite filtré sur membrane qui sera incubée en anaérobiose sur milieu de culture gélosé à 37°C (+/- 1°C) pendant 44h. Les colonies noires, produisant un précipité de sulfure de fer (FeS), sont dénombrées en tant que spores de micro-organismes sulfite-réducteurs.

2.1.2 Protocole de la Norme NF EN 26461-2, juillet 1993

L'échantillon d'eau doit être chauffé 15 minutes à 75°C +/- 5°C. 100 mL sont filtrés sur une membrane de porosité 0,2 µm. La membrane est ensuite déposée au fond d'une boîte de Pétri, face supérieure vers le bas et recouverte de 18 mL de milieu de culture sélectif (gélose sulfite-fer ou tryptose-sulfite). L'incubation est réalisée à 37°C en anaérobiose pendant 20h +/- 4h et 44h +/- 4h (avec une première lecture à 20h +/- 4h). Si un incubateur anaérobie est utilisé, la membrane filtrante peut être placée sur la surface de la gélose face supérieure tournée vers le haut. Les colonies noires sont alors dénombrées.

2.1.3 Protocole réalisé par le laboratoire LMCU, Veilles sanitaire et écologique (VSE)

L'analyse est réalisée selon les modalités de la norme, avec chauffage de l'échantillon 15 minutes à 75°C, filtration sur membrane 0,2 µm, dépôt de la membrane sur gélose Tryptone-Sulfite-Cyclosérine (TSC) sans cyclosérine (BioRad, référence 54419). La membrane est déposée sur gélose et incubée en anaérobiose pendant 24h. Après lecture, la membrane est réincubée pendant 24h supplémentaires en anaérobiose. Les colonies noires sont de nouveau dénombrées.

2.1.4 Protocole réalisé par la Société des eaux du nord (SEN)

L'analyse est réalisée sur la base de la norme, avec chauffage de l'échantillon 15 minutes à 75°C, filtration sur membrane 0,45 µm au lieu de 0,2 µm, dépôt de la membrane sur gélose au sulfite de fer (Biomérieux, référence 42603). La membrane est déposée sur gélose et incubée en anaérobiose en jarre ou en sachet muni d'un dispositif Genbag anaer (sachet avec générateur d'anaérobiose) de Biomérieux et contrôlé par un témoin d'anaérobiose pendant 24h, suivie d'une lecture et d'une réincubation pendant 24h supplémentaires en

anaérobie. Les colonies noires sont dénombrées. Pour faciliter l'observation des colonies atypiques, la SEN a ajouté à ce protocole une incubation de 24 heures en aérobiose.

2.1.5 Protocole utilisé par l'IPL

L'analyse est réalisée selon la norme avec chauffage de l'échantillon 15 minutes à 75°C, filtration sur membrane 0,2 µm, dépôt de la membrane sur gélose TSC sans cyclosérine (BIOKAR, référence non précisée dans le dossier). La membrane est déposée sur gélose et incubée en anaérobiose pendant 24h. Après lecture, la membrane est réincubée pendant 24h supplémentaires en anaérobiose. Les colonies noires sont de nouveau dénombrées. Pour pouvoir observer des colonies atypiques, l'IPL a ajouté à ce protocole une incubation de 24 à 48 heures en aérobiose.

La figure 1 illustre les étapes analytiques mises en œuvre par les différents laboratoires sollicités.

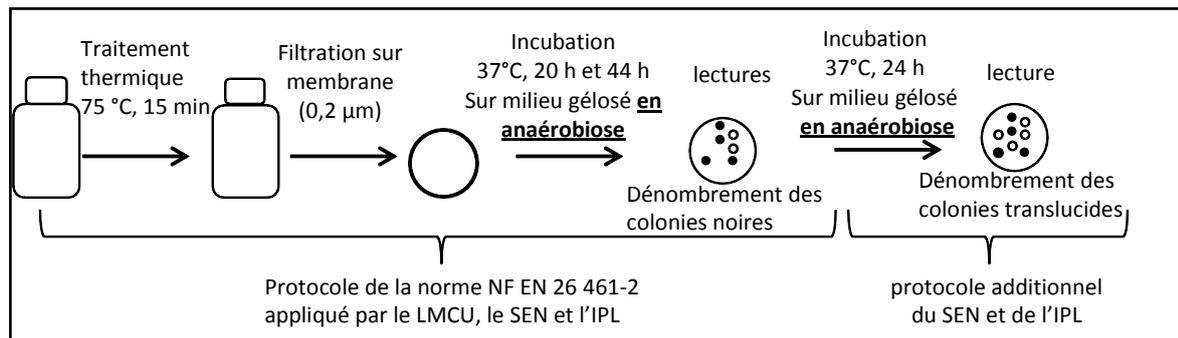


Figure 1 Schéma de la méthode d'analyse mise en œuvre

2.2 Résultats

2.2.1 Résultats du laboratoire LMCU/VSE

Des colonies blanches non caractéristiques (ne formant pas de précipité de sulfure de fer) sont observées de façon récurrente à des concentrations autour de 2 log pour 100 mL depuis fin août 2010 au niveau des points de prélèvement de Prêmesques en sortie du réservoir (19 à >200 spores pour 100 mL), vanne VRK (9 à 261 spores pour 100mL) et vanne VE19 (9 à >260 spores pour 100mL).

La communauté de communes a aussitôt transmis ces résultats au traiteur d'eau (Veolia Eau) qui a entrepris des analyses réglementaires (B3) sur l'eau en sortie d'Usine. Tous les résultats étaient conformes. Parallèlement, le laboratoire LMCU/VSE a caractérisé les colonies atypiques comme étant majoritairement des bactéries du genre *Bacillus*.

Une identification génomique par séquençage de l'ADN ribosomal 16S, réalisée par l'Institut Pasteur de Lille (IPL) après repiquage sur milieu TCS (Tryptone-Caséine-Soja) à 37°C pendant 48 h en aérobiose a été réalisée sur 34 souches. *Bacillus thermoamylovorans* a été identifié pour 21 souches (62%), *Bacillus licheniformis* pour 5 souches (15%), *Paenebacillus* spp pour 4 souches, *Bacillus vireti* pour 1 souche (3%) et *Brevibacillus borstelensis* pour 1 souche (3%).

2.2.2 Résultats du laboratoire des eaux du Nord

Des analyses sur les eaux de distribution, en différents points du réseau ont été réalisées suivant la norme NF EN 26461-2, juillet 1993 montrant la présence de colonies atypiques blanches (2 à 186 UFC/100mL), après incubation supplémentaire de 24h en aérobiose. Les colonies blanchâtres sont repiquées sur gélose TSA et identifiées sur galerie API 20E² et

² La galerie API 20E est dédiée à l'identification des bacilles gram négatifs.

API 50CHB³. Trois souches de *Bacillus licheniformis*, *B. circulans* et *B. coagulans* ont été identifiées.

Une identification génomique par séquençage de l'ADN ribosomal 16S de trois souches isolées les 10, 13 et 20 décembre 2010, réalisée par l'Institut Pasteur de Lille (IPL) a permis de montrer que ces bactéries correspondaient à l'espèce *Bacillus thermoamylovorans*.

2.2.3 Résultats de l'IPL

Des analyses réalisées sur les eaux de distribution, prélevées en différents points du réseau selon la norme NF EN 26461-2 (juillet 1993), montrent la présence de colonies atypiques blanches (près de 100 UFC/100mL) **après incubation supplémentaire de 24h à 48h en aérobiose**.

Une identification par galerie API 20A⁴ a permis de mettre en évidence *B. licheniformis* sur une souche isolée à partir du prélèvement du 15/11/2010 réalisé sur le réseau. Une identification génomique par séquençage de l'ADN ribosomal 16S a permis de montrer que les colonies atypiques étaient représentées majoritairement par l'espèce *B. thermoamylovorans* (34/51 identifications). Les autres souches isolées étant : *Paenebacillus* spp (6/51), *B. licheniformis* (5/51), *B. borstelensis* (2/51), *B. fucosivorans*⁵ (1/51), *Roseomonas genomospecies* (1/51), *B. vireti* (1/51), *Staphylococcus epidermidis* (1/51).

2.2.4 Informations complémentaires

Le laboratoire CAE de Veolia a également réalisé des analyses en utilisant un milieu de culture de chez AES laboratoires et deux types d'incubation : membrane déposée au fond de la boîte recouverte de gélose et membrane à la surface de la gélose et incubation en jarre en anaérobiose. Le protocole n'est pas détaillé dans le document fourni (Document SMAEL, 14 janvier 2011). Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont comparables. Il faut noter que toutes les analyses réglementaires réalisées par les différents laboratoires étaient satisfaisantes.

Des analyses complémentaires réalisées par le laboratoire IPL sur des **eaux brutes** prélevées par Veolia dans la Lys ont montré la présence de spores de *Bacillus* dans deux prélèvements (eaux de la rivière La Lys, les 15/11 et 22/11). Les dénombrements de spores de *Bacillus* spp dans l'eau brute sont respectivement de 2400/mL et 120/mL. Les identifications des souches isolées après culture des spores (le rapport entre le nombre de souches identifiées et le nombre de souches isolées n'est pas précisé) par galerie API 20A ont montré la présence de *B. licheniformis* et de *B. cereus*.

2.3 Discussion

Le suivi hebdomadaire, par le LMCU, des EDCH produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys a mis en évidence la présence de colonies atypiques lors de la recherche et du dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs selon la norme NF EN 26461-2. Ces résultats ont été confirmés par la SEN et l'IPL. Les analyses montrent la présence de colonies atypiques identifiées comme étant des *B. thermoamylovorans* pour la grande majorité. Par la suite, une pratique déviante de la norme est intervenue en ajoutant une

³ La galerie API 50CHB est dédiée à l'étude du métabolisme de 49 sucres. Elle est adaptée à l'identification des *Bacillus*.

⁴ La galerie API 20A, dédiée à l'identification des bactéries anaérobies, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.

⁵ *Bacillus fucosivorans* n'est ni référencé dans le manuel de bactériologie systématique Bergey's (De Vos *et al.*, 2009), ni dans la liste des noms des procaryotes répertoriés dans la nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

incubation complémentaire en aérobiose favorisant la croissance d'un plus grand nombre de colonies atypiques.

Les identifications par séquençage de l'ADN ribosomal 16S, réalisées par l'IPL sur les colonies atypiques isolées par les différents laboratoires, ont également mises en évidence la présence de *B. licheniformis*, *B. borstelensis*, *B. fucosivorans*, *Roseomonas genomospecies*, *B. vireti*, *Paenebacillus* spp. et *Staphylococcus epidermidis*.

D'après la bibliographie (OMS, 2011; Ostensvik *et al.*, 2004) et selon l'avis des experts nommés sur cette saisine, la présence de *Bacillus* spp. dans les EDCH n'est pas exceptionnelle. Elle est souvent observée lorsque les usines de production d'EDCH utilisent des eaux de surface. Cependant les spores de bactéries aérobies ne font pas partie des indicateurs d'efficacité de traitement retenus par le législateur.

B. cereus, responsable de la majorité des cas de gastroentérites provoqués par la présence de la bactérie dans les aliments, n'a été trouvée que dans les eaux brutes et non dans les EDCH produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys. La seule bactérie connue comme pouvant provoquer des gastro-entérites qui ait été identifiée dans les EDCH produites par cette usine est *B. licheniformis*. Aucun cas de gastro-entérite associé à la présence de *Bacillus* dans l'eau produite par l'usine d'Aire-sur-la-Lys et plus généralement dans les EDCH n'a cependant été rapporté.

3 La filière de traitement de l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas-de-Calais)

3.1 Contexte

L'eau délivrée par l'usine des eaux d'Aire-sur-la-Lys (SMAEL - Syndicat mixte d'adduction des eaux de la Lys) transite par une conduite de refoulement de 45 km de long et d'un diamètre de 1 000 mm. Cette conduite comporte 2 postes de rechloration, 108 décharges et 114 ventouses. Des spores ont été observées sur des échantillons prélevés dans la conduite à partir du 19 août 2010 en différents points. La conduite arrive à la station de refoulement de Prêmesques et ces eaux sont notamment achetées par LMCU (Lille métropole communauté urbaine). Le réservoir de Prêmesques est le point d'entrée des réseaux du syndicat de communes délégués à la Société des Eaux du Nord et au réseau du SMAEL.

3.2 La filière de traitement

Les données concernant la filière de traitement sont les suivantes :

L'eau brute est pompée dans la Lys (annexe 4 : Schéma de la filière). A la sortie des pompes, une injection de permanganate de potassium est prévue afin de limiter la présence d'algues et de matière organique.

En cas de forte augmentation des matières en suspension, une injection de chlorure ferrique est prévue pour faciliter la décantation dans la réserve d'eau brute.

L'eau passe ensuite dans une réserve d'eau brute d'un volume utile de 100 000 m³, ce qui représente une autonomie d'un jour de fonctionnement de la filière.

L'eau est ensuite décantée dans deux décanteurs. Le coagulant utilisé est du chlorure ferrique. Il n'y a pas d'utilisation d'adjuvant de floculation. Une injection de charbon actif en poudre est possible à ce stade.

L'eau transite ensuite à travers 8 filtres à sable garnis d'une hauteur de 1 m de matériau. La taille effective du matériau filtrant est de 0,95 mm et le coefficient d'uniformité est inférieur à 1,4 ce qui est tout à fait classique pour de la filtration rapide.

La vitesse de filtration varie entre 2,6 et 4,2 m/h lorsque tous les filtres sont en service, en fonction du débit de l'usine. Ces vitesses peuvent atteindre 5,2 à 8,3 m/h en cas de lavage ou d'indisponibilité de certains filtres, ce qui peut entraîner ponctuellement de fortes variations de vitesse.

Les filtres sont lavés à contre-courant à l'air et à l'eau, à des débits respectifs de 5 680 m³/h et 1 400 m³/h, modalité classique. Les eaux de lavage des filtres sont acheminées dans un bassin de stockage, laissées décanter et le surnageant est renvoyé en tête d'usine.

L'eau est ensuite désinfectée par ozonation dans 2 tours parallèles à 2 compartiments de 6 minutes de temps de contact. Le taux de traitement en ozone est ajusté de manière à maintenir un résiduel de 0,4 mg/L en sortie des tours d'ozonation. Un pilotage de l'ozonation est fait par l'exploitant (pilotage au CT⁶ afin de réduire la formation de bromates).

Une injection de bisulfite de sodium est réalisée en sortie de tour d'ozonation afin de neutraliser l'ozone résiduel.

⁶ La CT correspond au produit du temps de contact entre le désinfectant et le micro-organisme et de la concentration de désinfectant, exprimé en mg·L⁻¹·min, nécessaire pour désinfecter spécifiquement un micro-organisme cible.

La dernière étape de traitement est une chloration. Le chlore est injecté en amont d'une bache de stockage de 5 000 m³ de façon à obtenir un résiduel de 0,4 mg/L en sortie de la bache. La bache est dimensionnée pour permettre un temps de contact de 1 h au débit nominal de l'usine et 2 h au débit de fonctionnement habituel, ce qui permet d'assurer des CT suffisants pour induire un effet bactéricide et virucide.

L'eau est ensuite déchlorée par injection de bisulfite de sodium avant son refoulement vers le réservoir de Prêmesques.

3.3 Amélioration de la filière prévue

La construction d'un débourbeur en amont du bassin de stockage d'eau brute était prévue avec une mise en service au 1^{er} trimestre 2011. Il était également prévu l'injection de chlorure ferrique et de polymère (floculant) en amont de ce débourbeur. Les informations disponibles au moment de cette expertise ne permettent pas de savoir si cette modification de la filière est effective à la date de publication du présent rapport.

3.4 Analyses de surveillance

Le Syndicat mixte d'adduction des eaux de la Lys (SMAEL) a transmis un rapport concernant la qualité de l'eau à Prêmesques. L'exploitation de l'usine est confiée à Veolia depuis janvier 2004.

Des analyses de surveillance sont effectuées tous les jours par l'exploitant dans le laboratoire de l'usine à différentes étapes de la filière de traitement (eau brute, eau décantée, eau filtrée et eau traitée). Certains paramètres sont analysés à des fréquences différentes et des analyses microbiologiques sont réalisées par le LMCU 2 fois par mois.

La figure 2 permet de localiser les différents points de prélèvement réalisée au titre de la surveillance de l'exploitant.

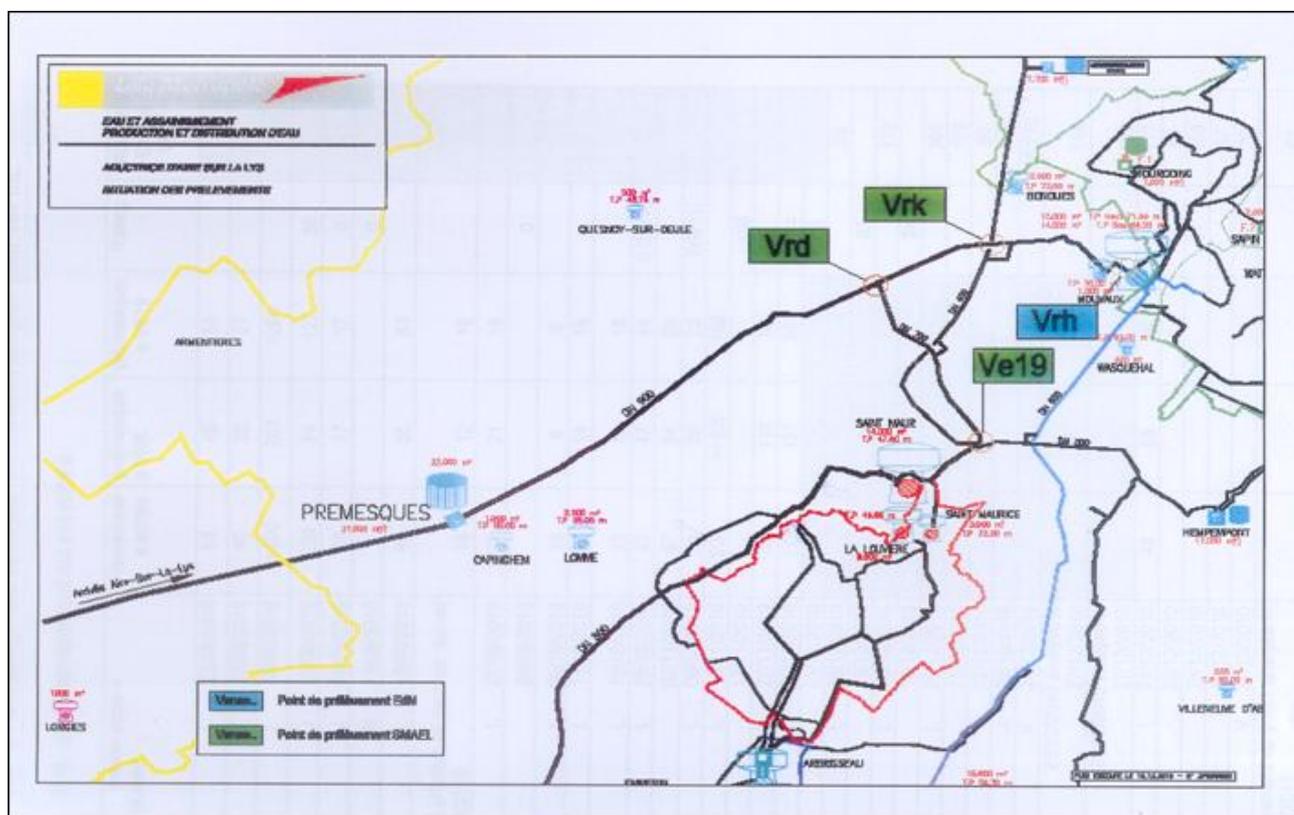


Figure 2 : Localisation des points de prélèvements.

Les tableaux suivants donnent la fréquence de surveillance.

Tableaux 1 et 2 : Fréquences de surveillance.

Analyses réalisées au laboratoire de l'usine

Fréquence	Type d'analyse	Point de Prélèvement
Lundi au dimanche	Chlore libre et total	Eau traitée
	Turbidité	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau filtrée Eau Traitée
Lundi au samedi	Matières Oxydables	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau filtrée Eau Traitée
	Ammonium	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau filtrée
	Température	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau filtrée Eau Traitée
Lundi	Nitrite	Eau filtrée
Lundi	Fer Manganèse pH Oxygène dissous Ammonium Conductivité	Eau traitée
Mercredi	Ozone	Tours primaire 1, tour secondaire 1 sortie déozonation
Jeudi (de mars à octobre)	Seuil odeur	Eau Lys Eau réserve Eau Traitée
Vendredi	Seuil gout	Eau traitée
1 ^{er} lundi du mois	Ammonium, Nitrite Fer, Manganèse pH Oxygène dissous Conductivité	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau filtrée Eau Traitée

6 - 01/2011

Analyses réalisées par un laboratoire extérieur

Fréquence	Type d'analyse	Point de Prélèvement	
Lundi	B3 + analyses terrain (Cl libre, Total, pH, T', turbidité)	Sortie Aie, Entrée Premesques Sortie Premesques +7 points réseaux	
	COT	Eau réserve Eau filtrée Eau Traitée Entrée Premesques	
Jeudi	B3 + analyses terrain (Cl libre, Total, pH, T', turbidité)	Sortie Aie, Entrée Premesques Sortie Premesques Entrée Beuvry Sortie Beuvry +7 points réseaux	
	COT	Eau réserve Eau filtrée	
1 ^{er} lundi du mois	Pesticides	Eau réserve Eau traitée	
	Ammonium Nitrites	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau filtrée Eau Traitée	
	Fer Manganèse	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau Traitée	
	OHV	Eau Traitée	
	Bromure	Eau Lys	
	CODB COD COT	Eau Lys Eau réserve Eau décantée Eau filtrée Eau Traitée	
	1 ^{er} lundi du mois de Mars à octobre	Algues	Eau Lys Eau réserve
	1 ^{er} lundi du mois + adaptation aux conditions climatiques	Bromales	Eau traitée +1 point réseau
	6 en mars-avril, 6 en octobre-novembre	Cryptosporidium-Giardia	Eau réserve

7 - 01/2011

Les résultats des diverses analyses de surveillance ne montrent pas de non-conformités (germes tests de contamination fécale notamment) sur les eaux produites par l'usine.

Plusieurs campagnes d'analyses spécifiques ont été effectuées par le laboratoire du CAE (centre de recherches de Veolia) à partir du 1^{er} novembre 2010. Les résultats montrent que la présence de bactéries anaérobies sulfito-réductrices est importante dans l'eau brute : dénombrement de 20 à 300 UFC /20 mL. La présence de bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans l'eau filtrée a également été mise en évidence dans 3 prélèvements sur 4 (dénombrement 2 à 4 UFC /100 mL).

La présence de spores de *Bacillus* a été détectée dans l'eau brute avec des dénombrements variant entre 120 et $2,4 \times 10^3$ UFC /mL dans l'eau brute et dans l'eau filtrée avec des dénombrements compris entre < 1 et 3 UFC / mL (analyses réalisées par le laboratoire IPL).

La détection des bactéries aérobies sporulantes ayant été observée en différents points du réseau, une analyse plus fine des résultats des paramètres de surveillance de l'usine a été réalisée.

Les résultats de surveillance en différents points du réseau montrent :

- une présence de chlore constante avec des résiduels de chlore élevés (0,4 à 0,5 mg/L de chlore libre) ;
- une variation de pH, liée d'après l'exploitant, à un problème d'instrumentation ;

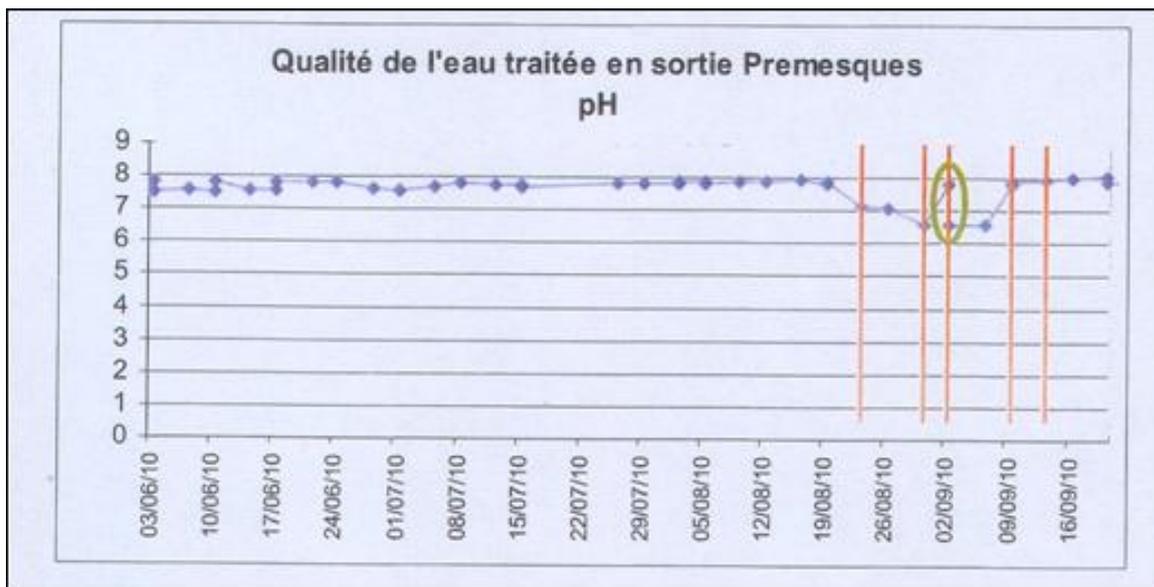


Figure 3 : Variations de pH observées en fonction du temps.

- une variation de turbidité significative aux points VRK et Prèmesques notamment autour du 10 août 2010.

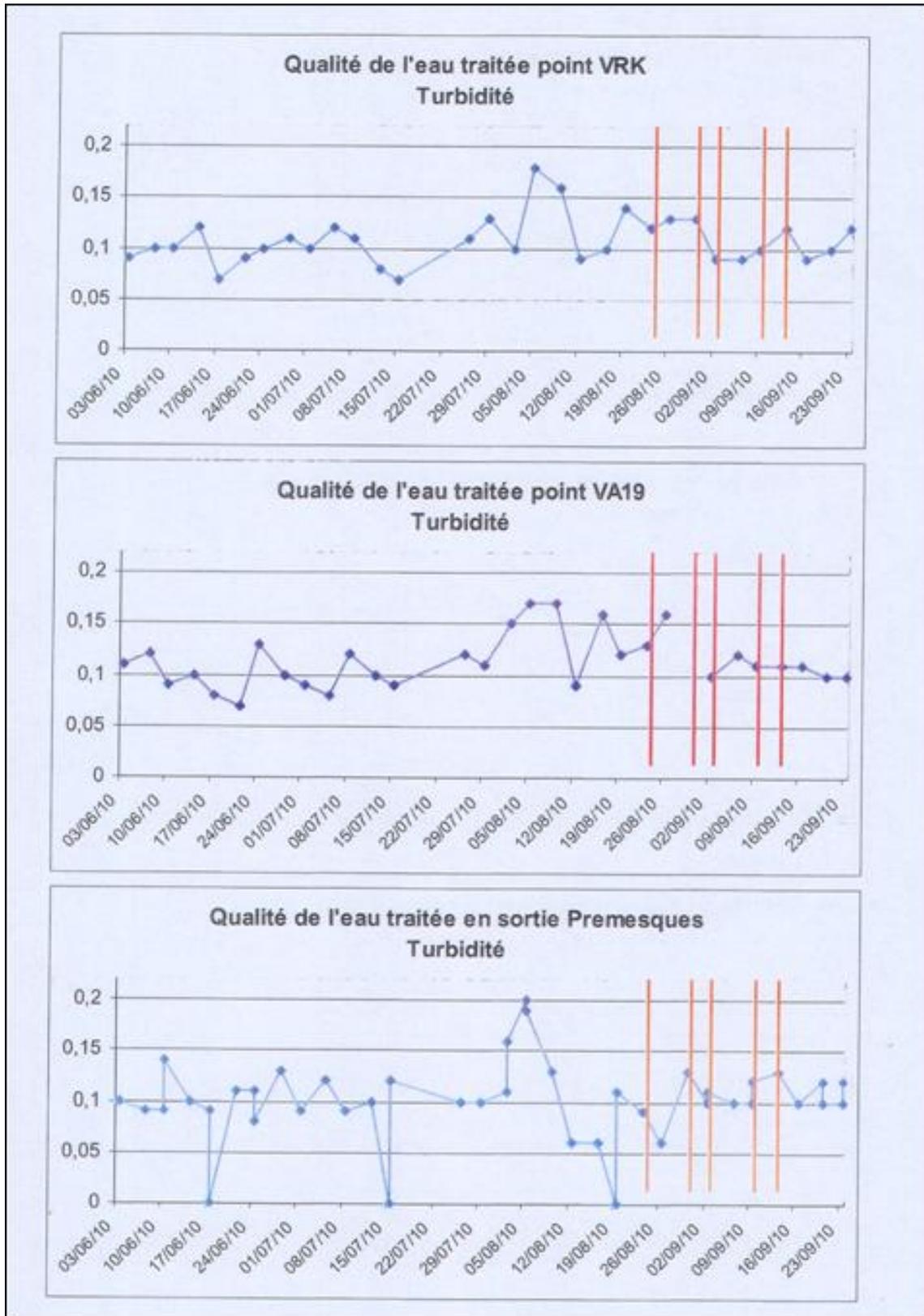


Figure 4 : Variations de turbidité observées en fonction du temps.

3.5 Analyse critique de la filière de traitement et de son fonctionnement

3.5.1 Filière

La filière de traitement classique de clarification est dimensionnée pour traiter 100 000 m³/j. Néanmoins:

- les vitesses de filtration peuvent être parfois élevées notamment en cas de lavage de filtres et les variations brutales de vitesse de filtration sont susceptibles de provoquer des à coups hydrauliques pouvant conduire au décrochement de micro-organismes, notamment les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et d'autres micro-organismes retenus majoritairement par les matériaux filtrants (Oocystes de *Cryptosporidium* notamment) ;
- les eaux de lavage des filtres sont simplement décantées sans ajout de réactif chimique. Le recyclage des eaux de lavage entraîne une charge plus importante en micro-organismes dans l'eau brute, qui augmente la charge en micro-organismes dans les filtres et limite les capacités de rétention de ces micro-organismes par les filtres ; lors de variations brutales de vitesse ;
- les résultats des analyses de surveillance sur la période considérée montrent une variation de la qualité de l'eau produite par l'usine notamment pour ce qui concerne la turbidité et le pH.

Dans cette filière de traitement, la seule barrière contre les *Cryptosporidium* est la filtration. Les analyses de surveillance sur l'eau filtrée ont mis en évidence une présence quasiment systématique de bactéries anaérobies sulfito-réductrices, ce qui met en évidence une fragilité de cette étape de filtration. Les variations de turbidité observées peuvent également témoigner d'un traitement de clarification pas toujours optimisé.

Les étapes d'ozonation et de chloration de cette filière de traitement sont des procédés de désinfection qui n'ont que peu d'effet sur les bactéries anaérobies sulfito-réductrices.

Même si aucun oocyste de *Cryptosporidium* n'a été détecté dans l'eau traitée par l'usine, des réserves sur la maîtrise de l'étape de filtration de cette usine peuvent être émises.

3.5.2 Connaissances bibliographiques et aspect critique

Les bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont aujourd'hui considérées comme un indicateur d'efficacité de filtration. L'arrêté du 11 janvier 2007 donne une référence de qualité de 0 UFC / 100 mL et permet de vérifier l'abattement de la filière de traitement sur le paramètre *Cryptosporidium*.

De nombreux micro-organismes indigènes tels que les spores aérobies et les *Clostridia* sulfito-réducteurs / *Clostridium perfringens* ont également souvent été considérés comme indicateur d'efficacité de traitement de *Cryptosporidium* et *Giardia* (Chung *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2000; Lechevallier, 2004; Nieminski, 1997).

L'abattement moyen de spores de *Bacillus* par filtration dans 22 installations de traitement correspond à celui des oocystes de *Cryptosporidium* (1,6 à 1,8 log) (Nieminski, 1997). Lechevallier *et al.* ont déterminé l'inactivation de cultures de *Bacillus subtilis* et autres spores aérobies par l'ozone et ont comparé ces cinétiques d'inactivation à celles de *Cryptosporidium* à 20-22° C. Le produit de la concentration en désinfectant et du temps de contact (CT) nécessaire pour l'inactivation de 2 log de spores aérobies était de 1,72 mg.min.L⁻¹ à pH 6,3 et 3,58 mg.min.L⁻¹ à pH 8,2 (Lechevallier, 2004). Ceci est comparable au CT de 3,5 reporté par Finch en 1994 pour l'abattement de *Cryptosporidium* à pH 6,9 et à 22 °C (Finch *et al.*, 1994).

Par ailleurs, *B. subtilis* est un des micro-organismes utilisés pour les tests de biodosimétrie utilisés pour valider les doses délivrées dans les réacteurs UV utilisés pour la désinfection des eaux (US EPA et réglementations Autrichiennes et Allemandes).

Il a été montré que *B. subtilis* était un bon indicateur de l'inactivation de *C. parvum* par ozonation à température de 20° C. Cependant, pour des températures plus faibles, *B. subtilis* est inactivé par l'ozone avant *C. parvum* (Driedger *et al.*, 2001) (Figure 5).

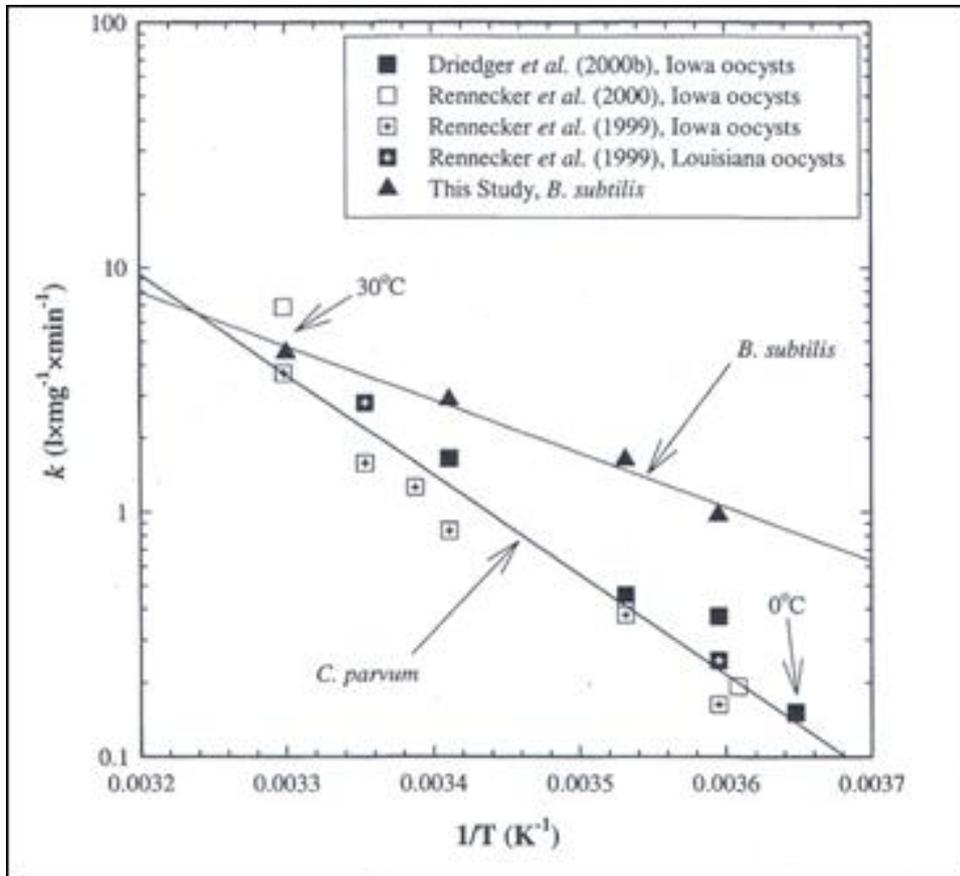


Figure 5 : Comparaison de l'inactivation de *C. parvum* et de *B. subtilis* par ozonation en fonction de la température (Driedger *et al.*, 2001).

Brown et Cornwell ont montré en 2007 que les spores aérobies étaient également un bon indicateur d'efficacité des traitements physiques traditionnels de clarification tels que la coagulation, la floculation et la filtration. Ces micro-organismes sont faciles à analyser et ces trois types de traitement permettent de les abattre de 4 à 5 log (Brown et Cornwell, 2007).

Sommer *et al.* ont montré que les spores de *B. subtilis* sont de bons indicateurs d'efficacité de traitement de désinfection mettant en œuvre l'ozone, le chlore et le peroxyde d'hydrogène. Ces spores sont plus résistantes que les indicateurs de contamination fécale et les *Cryptosporidium* (Sommer *et al.*, 2002).

A noter cependant que les spores aérobies peuvent se développer dans les filtres, contrairement aux spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices. Dans une étude sur les différents micro-organismes présents dans différentes filières comprenant des procédés de filtration variées (filtration sur sable, filtration sur charbon actif en grain (CAG),...), Baudin *et al.* ont montré que les bactéries aérobies sporulantes sont les plus présentes sur les filières qu'ils ont étudiées. La filtration peut contribuer à l'abattement des bactéries aérobies sporulantes. Cependant, il est souvent observé une colonisation des médias de filtration par ces bactéries (Baudin *et al.*, 2008).

Hijnen *et al.* ont également étudié l'élimination des spores de bactéries sulfito-réductrices et ont montré qu'elles étaient un bon indicateur d'efficacité de filtration après une étape de coagulation. Ces spores sont mal éliminées par simple décantation. Le recyclage des eaux de lavage des filtres en tête de traitement après une simple décantation peut donc conduire à une charge supplémentaire en *Clostridium* (Hijnen *et al.*, 1997).

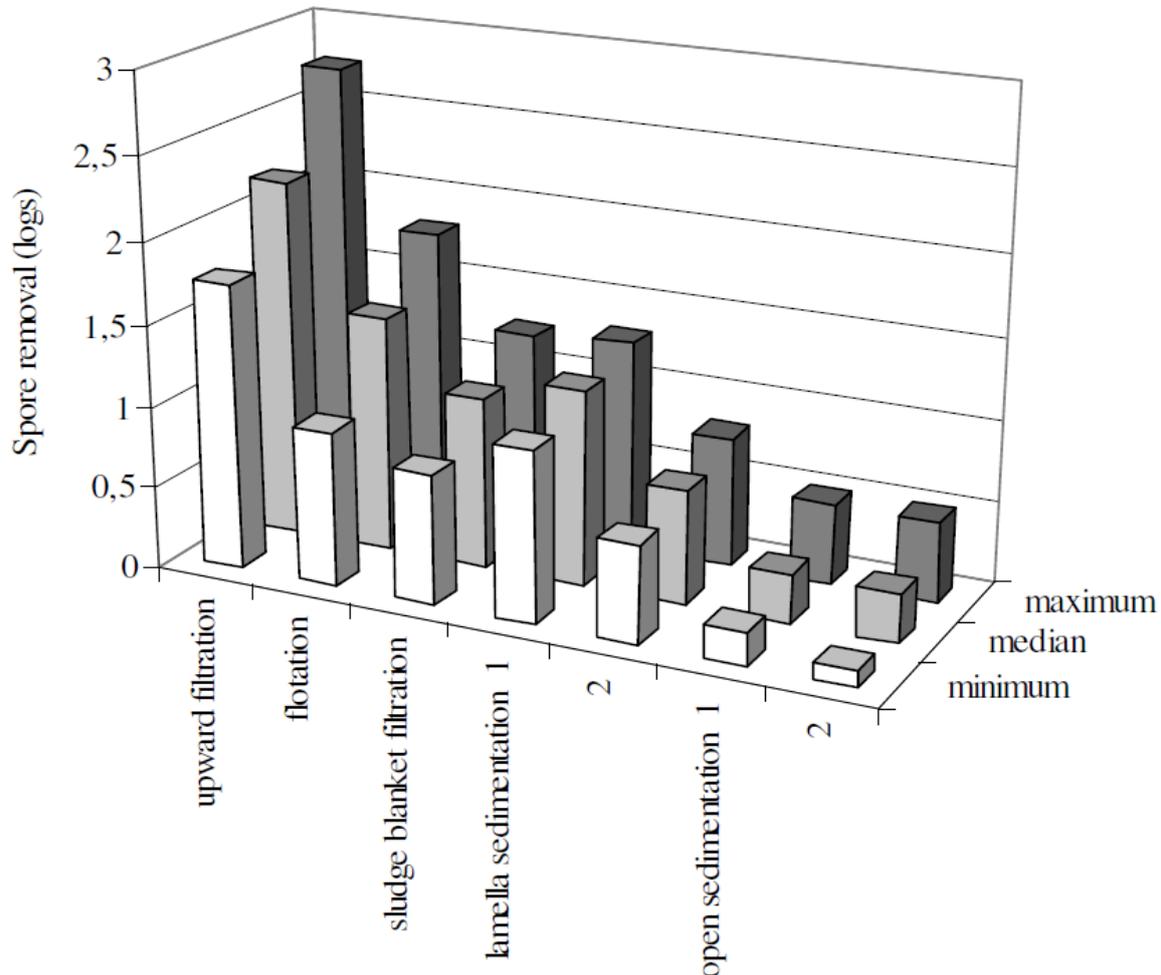


Figure 6 : Élimination des spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs par différents types de procédés de coagulation filtration (Hijnen *et al.*, 1997; OMS, 2011).

Les spores de *Clostridium perfringens* étant plus petites que celles des oocystes de protozoaires, leur présence dans l'eau traitée est un indicateur de présence éventuelle de *Cryptosporidium*. (OMS, 2011). Elles sont donc de bons indicateurs de l'efficacité de la filtration.

Par ailleurs, la résistance de *Bacillus* aux traitements de chloration est importante. Des CT élevés (40 à 400 mg.min/L) permettent d'abattre 2 log de *B. globiglis* (Shane *et al.*, 2011).

3.6 Conclusion sur la filière de traitement et son fonctionnement

Les spores de bactéries aérobies sont souvent retrouvées dans les filières de traitement d'eau destinée à la consommation humaine. Leur grande résistance aux traitements de désinfection chimique classiquement utilisés dans ces filières peut expliquer leur présence dans des eaux traitées. De plus, il a été montré que ces bactéries pouvaient se développer au cours du processus de traitement notamment lors des étapes de filtration.

Concernant l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys, la filière de traitement ne semble pas présenter un fonctionnement optimal face à la rétention de ces spores ainsi que celle de bactéries anaérobies sulfito-réductrices. Cependant, il est difficile d'en appréhender complètement les raisons sur la base des éléments disponibles dans le dossier. Aucune indication n'est donnée dans le dossier transmis en appui à la saisine sur des interventions éventuelles (travaux, nettoyages, etc.) ayant pu avoir lieu avant la période de mise en évidence de bactéries sporulées cultivant après une incubation complémentaire en aérobiose, dans le cadre de la surveillance de l'exploitant.

4 Évaluation du risque.

4.1 Exposition

A ce jour, l'eau de boisson n'est pas identifiée comme une source d'infection par des *Bacillus* spp pathogènes, incluant *Bacillus cereus*. La possibilité de transmission de *Bacillus* par voie hydrique n'est pas prouvée (OMS, 2011).

Les infections à *Bacillus* spp sont majoritairement associées à la consommation de certains aliments, spécialement le riz, les pâtes et les légumes, ainsi que des produits à base de lait et de viandes crues. Les pathologies résultent généralement de l'ingestion d'une importante quantité de cellules de la bactérie ou des toxines qu'elle peut produire (EFSA, 2005; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Ces conditions sont susceptibles d'être réunies en fin de phase de croissance des *Bacillus* spp pathogènes. *B. cereus* est l'une des espèces pathogènes de *Bacillus* les mieux documentées. C'est l'espèce la plus souvent mise en cause dans les intoxications alimentaires provoquées par des *Bacillus*.

L'avis de l'EFSA de 2005 indique que le sol peut contenir entre 10^3 et 10^5 spores de *B. cereus* par gramme (Christiansson *et al.*, 1999; EFSA, 2005; Guinebretiere *et al.*, 2003; Te Giffel *et al.*, 1995). Le développement de souches de *B. cereus* et de souches d'espèces apparentées comme *B. thuringiensis* a été mis en évidence dans la rhizosphère des plantes et dans le tube digestif de lombrics (EFSA, 2005; Halverson *et al.*, 1993; Hendriksen et Hansen, 2002). Le climat est également cité comme ayant une influence sur la population de *B. cereus* présente dans le sol (EFSA, 2005; von Stetten *et al.*, 1999).

Le sol est la première source de contamination des aliments par des spores de *B. cereus*. A titre d'exemple, les mêmes génotypes ont été trouvés dans le sol de coopératives laitières et dans le lait qu'elles collectent (Christiansson *et al.*, 1999; EFSA, 2005), ou dans le sol d'exploitation de maraichage et dans des aliments cuits frais contenant des légumes issus de ces exploitations (EFSA, 2005; Guinebretiere *et al.*, 2003). Des contaminations secondaires sont également constatées pendant les processus de transformation. Elles seraient favorisées par les propriétés d'adhésion des *B. Cereus*, qui peuvent former des biofilms et persister sur les surfaces des équipements de production (Andersson *et al.*, 1995; EFSA, 2005). Aussi, les matières premières lactées peuvent être contaminées par des souches de *B. cereus* qui persistent dans les tanks de lait (EFSA, 2005; Svensson *et al.*, 2004). Les spores de *B. cereus* résistent aux processus de pasteurisation et de déshydratation (EFSA, 2005; Eneroth *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 1999; Te Giffel *et al.*, 1996).

Dans les aliments complexes, certains ingrédients sont identifiés comme des sources importantes de contamination par des spores de *B. cereus*, notamment les agents de texture (EFSA, 2005; Guinebretiere *et al.*, 2003), les œufs liquides, les herbes aromatiques et les épices (EFSA, 2005; International Commission on Microbiological Specification for Foods, 2005). Les produits de boulangerie seraient très souvent contaminés par *B. cereus*, à des concentrations relativement faibles 10^2 UFC / g (Te Giffel *et al.*, 1996).

Les spores de *B. cereus* sont aussi détectées dans les industries de papeterie et de packaging (EFSA, 2005; Pirttijarvi *et al.*, 2000), ce qui constitue une voie supplémentaire de contamination des aliments.

Ainsi, selon l'EFSA (2005), les *B. cereus* sont ubiquitaires et leur présence dans les matières premières alimentaires apparaît comme inévitable. Les bonnes pratiques d'hygiène et la bonne conception des équipements de production apparaissent comme essentielles pour en limiter la contamination.

Dans son avis de 2005, l'EFSA évoque également d'autres *Bacillus* spp identifiés comme des causes de dégradation des aliments et d'intoxications alimentaires : *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* (EFSA, 2005; Guinebretiere *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 1992).

Certaines souches sont capables de se multiplier dans des jus de tomate en conserve (EFSA, 2005; Rodriguez *et al.*, 1992), ou impliquées dans les fermentations traditionnelles de haricots plats en Afrique et en Inde (EFSA, 2005; Ogbadu et Okagbue, 1988; Sarkar *et al.*, 2002).

Les *Bacillus* étant très présents dans les sols, il n'est pas surprenant d'en retrouver dans les eaux continentales. Comme le montrent Østensvik *et al.* (2004), en Norvège, différentes espèces de *Bacillus* peuvent être identifiées dans des eaux de surface : *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*, *B. circulans*, ainsi que d'autres espèces de *Bacillus* spp non identifiées (Østensvik *et al.*, 2004). Baudin *et al.* ont notamment dénombré entre 1 et $2 \cdot 10^2$ spores de bactéries aérobies / mL dans des eaux brutes (Baudin *et al.*, 2008). D'après les résultats fournis par le laboratoire de l'IPL, chargé des analyses dans le cas d'Aire-sur-la-Lys, l'eau de la rivière la Lys contiendrait entre $1,2 \cdot 10^2$ et $2,4 \cdot 10^3$ spores de *Bacillus* spp / mL.

L'étude de Østensvik *et al.* montre également la présence de *Bacillus* spp, notamment *B. cereus*, dans les eaux de distribution, préalablement traitées par filtration et chloration, satisfaisant par ailleurs aux limites de qualité microbiologiques d'une eau destinée à la consommation humaine (absence de coliformes et d'*Escherichia coli* dans 100 mL). Les spores de *Bacillus* spp sont dénombrés à hauteur de 15 à 140 UFC/ 100 mL dans les eaux brutes et entre 15 et 38 UFC/ 100 mL dans les eaux de distribution. Il est ainsi mis en évidence le peu d'effet de la filtration et de la chloration sur les spores de *Bacillus* spp. Les auteurs ne concluent pas sur la part de l'exposition aux *Bacillus* que peut représenter l'eau de boisson. En revanche, ils suggèrent que l'eau de boisson traitée par filtration et chloration puisse être à l'origine de contaminations par des *Bacillus* spp dans les industries alimentaires (Østensvik *et al.*, 2004).

Dans les rares échantillons d'eau traitée par l'usine d'Aire-sur-la-Lys qui contenaient des *Bacillus* spp, les concentrations mesurées étaient de l'ordre de 9 à >260 UFC/100mL. Ces valeurs semblent du même ordre de grandeur que les résultats de dénombrement obtenus par Østensvik *et al.* en Norvège ou Francis *et al.* (Francis *et al.*, 2001) en Angleterre (1 à 41 spores/100mL).

Dans l'hypothèse où l'eau de boisson contienne des *Bacillus* spp susceptibles de provoquer des infections humaines, il semble opportun de mettre en perspective les apports potentiels de ces bactéries par l'eau de boisson et les autres apports potentiels, à commencer par ceux des aliments. Pour cela, la comparaison des concentrations en *Bacillus* spp dans les eaux de boisson et celles mesurées dans les autres sources potentielles est pertinente.

L'annexe 6, issue du rapport de l'EFSA de 2005 donne des résultats de dénombrement de *B. cereus* obtenus après analyse de différents types d'aliments. Selon les aliments, les valeurs observées sont comprises entre 10 UFC/ mL (ou UFC/g) (pour des plats cuisinés réfrigérés) à 10^6 UFC/mL (pour des plats cuisinés conservés à 10°C, des herbes aromatiques ou des épices).

La comparaison entre les concentrations de *Bacillus* spp. retrouvées dans les eaux de boisson, que ce soit à Aire-sur-la-Lys ou en Norvège, et de *Bacillus cereus* dans les aliments, permet de constater que ces eaux contiennent de l'ordre de 10^2 à 10^6 fois moins de *Bacillus* que les aliments. En complément, il faut souligner que les *Bacillus* spp ponctuellement détectés dans l'eau, ne sont pas nécessairement des espèces aussi pathogènes que les *B. cereus*, connus comme étant à l'origine d'intoxications alimentaires.

Aussi, l'exposition humaine potentielle à des *Bacillus* spp par ingestion, principale voie d'intoxication pour cette bactérie, via l'eau de boisson, apparaît extrêmement faible au regard de l'exposition potentielle via les autres aliments.

4.2 Estimation du risque

Les *Bacillus* spp peuvent être détectés dans des EDCH, satisfaisant aux limites de qualité microbiologiques exigées par la réglementation. Cela est dû à la résistance des spores de *Bacillus* aux processus de désinfection chimique couramment utilisés pour le traitement des eaux destinées à la consommation humaine. Dans la littérature, il n'existe pas de données soutenant l'hypothèse selon laquelle les *Bacillus* spp. seraient à l'origine de pathologies hydriques. La mise en œuvre d'une stratégie de gestion spécifique à ces bactéries n'est donc pas requise. Aussi l'OMS ne préconise pas de concentration maximale en *Bacillus* spp admissible dans les EDCH, ni pour la population générale, ni pour des populations sensibles (OMS, 2011).

Cependant, il est possible d'analyser la situation décrite dans le cas d'Aire-sur-la-Lys. Selon les données fournies par l'ARS, dans le cas où la croissance en aérobiose des colonies atypiques a été constatée après mise en culture d'échantillons d'EDCH prélevée en sortie de la station de reprise de Prêmesques, les concentrations en spores mesurées sont de l'ordre de 0,09 à 2,6 UFC / mL d'eau. Ces concentrations sont très inférieures à la dose infectieuse retenue par l'Afssa⁷ pour *B. cereus* : 10^5 UFC / g d'aliments, *proche de* 10^5 UFC / mL d'eau. En outre l'eau étant pauvre en nutriments, il n'est pas prouvé que *B. cereus* puisse produire la toxine émétique dans ces conditions (Agata *et al.*, 1999; Rosenfeld *et al.*, 2005).

De même, les pathologies d'origine alimentaire provoquées par *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus*, ont toujours été associées à de fortes concentrations dans les aliments responsables, de l'ordre de 10^5 cellules ou spores par gramme. Aussi, les risques sanitaires liés à la présence de *B. cereus* ou de *B. licheniformis* dans les EDCH aux concentrations maximales observées dans l'eau traitée par l'usine d'Aire-sur-la-Lys semblent négligeables.

En ce qui concerne les autres espèces de *Bacillus* identifiées dans les eaux d'Aire-sur-la-Lys, aucune dose infectieuse n'est documentée. Aussi, il n'est pas possible de conclure quant au niveau de risque sanitaire qu'implique la présence de ces espèces dans les EDCH pour l'Homme. Cependant, aucun élément ne permet de penser que ces autres espèces représentent un danger en cas de présence dans de l'eau.

Compte tenu du niveau de risque estimé négligeable dans le cas de scénarios d'exposition réalistes, il est nécessaire d'envisager un scénario d'exposition très défavorable, qui maximise l'estimation du risque, pour tester le pire des cas. Dans ce but, l'exercice est réalisé selon l'hypothèse, très peu probable, où une grave défaillance de la filière de traitement conduirait à une injection accidentelle d'eau brute pompée dans la Lys, directement dans le réseau de distribution d'eau destinée à la consommation humaine, peut être envisagée. D'après les résultats fournis par les laboratoires de l'IPL et de Veolia, chargés des analyses dans le cas d'Aire-sur-la-Lys, les concentrations maximales mesurées dans l'eau de la rivière la Lys sont de $2,4 \cdot 10^3$ spores de *Bacillus* spp./mL. A titre de comparaison, Ostensvik *et al.*, ont mis en évidence, dans des eaux brutes en Norvège, des concentrations en espèces responsables de gastro-entérites, *B. thuringiensis*, *B. cereus* et des souches cytotoxiques de *B. subtilis*, atteignant au maximum 14 spores / mL (Ostensvik *et al.*, 2004). Aussi, même en prenant comme deuxième hypothèse, également très défavorable, que l'intégralité des *Bacillus* présents dans l'eau brute soient des espèces pathogènes pour l'Homme (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ou *B. pumilus*), il apparaît que l'eau ne contient pas une concentration en *Bacillus* suffisante pour provoquer habituellement des pathologies humaines par la consommation d'un aliment (10^5 spores de *Bacillus cereus* / mL). Là aussi le risque sanitaire lié à la présence de *Bacillus* dans l'eau apparaît extrêmement faible. Il faut rappeler, que l'eau brute est susceptible de contenir de nombreux micro-organismes autrement plus pathogènes que *Bacillus*, susceptibles de provoquer des pathologies hydriques.

⁷ Dans la fiche *Bacillus cereus* de 2009, actuellement en cours de révision, mais sans modification prévue sur ce point.

Concernant spécifiquement les usages et les populations sensibles, particulièrement les “patients à haut risque” tels que définis dans la Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002⁸, ils doivent être maintenus dans un environnement adapté à leur état. Aussi des mesures particulières sont nécessaires et doivent être appliquées pour le traitement de l’eau qui leur est fournie, avec notamment des mesures visant à garantir une concentration en bactéries inférieure aux limites de détection de la méthode par culture. Ceci est valable pour toutes les bactéries, notamment les *Bacillus* spp. Les experts considèrent que l’observation rigoureuse de ces précautions sont de nature à limiter le risque liés à la présence dans les EDCH de *Bacillus* spp., y compris les plus pathogènes comme *B. cereus*, pour les populations dites sensibles.

Plus concrètement, certains faits semblent appuyer les hypothèses et les résultats de la présente estimation de risque. Bien que les éventuels cas d’infection à *Bacillus* liés à la consommation d’eau ne fassent pas l’objet d’un recueil d’information spécifique à grande échelle, il faut en effet insister sur l’absence de cas de ce type recensés à ce jour.

⁸ Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé : les patients dits « **patients à haut risque** » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d’organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c’est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours).

5 Conclusions et recommandations

5.1 Signification des résultats analytiques

Il ressort du dossier fourni par le pétitionnaire qu'à Aire-sur-la-Lys, quels que soient les milieux utilisés, la lecture des boîtes de culture soumises à une incubation supplémentaire en aérobiose a montré la présence de colonies atypiques translucides qui ne correspondent pas aux caractéristiques des colonies de BASR. Elles ont été identifiées, pour leur grande majorité, comme étant des *B. thermoamylovorans*. Selon la norme NF EN 26461-2, seules les colonies noires doivent être dénombrées en tant que BASR après incubation pendant 48h à 37°C.

Ces colonies ont donc été mises en évidence surtout après incubation complémentaire de 24 à 48 h en condition d'aérobiose, ce qui ne correspond pas au principe de la norme.

Par ailleurs, la présence de *Bacillus* spp. n'est pas exceptionnelle dans l'environnement. Elle est souvent observée lors d'analyse d'eaux, lorsque les usines de production d'EDCH utilisent des eaux de surface.

5.2 Risques sanitaires

Les espèces de *Bacillus* mises en évidence dans les eaux produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys sont des bactéries ubiquistes. Certaines de ces espèces sont pathogènes ou pathogènes opportunistes pour l'Homme par voie alimentaire.

Elles devraient être éliminées par les filières de traitements, dans les mêmes proportions que les bactéries anaérobies sulfito-réductrices. Les procédés de traitement installés dans l'usine d'Aire-sur-la-Lys susceptibles d'être efficaces pour réduire les concentrations de bactéries du genre *Bacillus* sont essentiellement la coagulation – floculation, la décantation et la filtration. Les procédés de désinfection mettant en œuvre des oxydants ont peu d'effet sur les formes sporulées.

La quantification du risque lié à la présence des espèces de *Bacillus* dénombrées dans les eaux produites par l'usine d'Aire-sur-la-Lys se heurte à la faiblesse des données disponibles, autant en ce qui concerne l'exposition que les relations doses réponses. Cependant, il apparaît que :

- Les pathologies provoquées par des *Bacillus* pathogènes après infection par voie alimentaire, ont à ce jour été observées après consommation d'aliments contenant de fortes concentrations en *Bacillus* pathogènes (de l'ordre de 10^5 spores / g ou mL).
- aucune donnée ne permet de penser que ces fortes concentrations ont pu être atteintes dans des eaux traitées par l'usine d'Aire-sur-la-Lys.

Ainsi, au regard des données fournies, le risque sanitaire lié à la consommation d'eau produite par l'usine d'Aire-sur-la-Lys et contenant des *Bacillus* spp apparaît négligeable.

Cependant, d'un point de vue technique, la présence de spores de *Bacillus* spp dans les eaux produites par cette usine révèle que les micro-organismes présents dans l'eau brute, peuvent, dans certaines conditions (eau brute provenant de la Lys ponctuellement très chargée en micro-organismes, arrêt de certains filtres de l'installation,...), ne pas être complètement éliminés par la filière de traitement en place. En fonction de la fréquence du phénomène, cette constatation doit amener le gestionnaire de l'installation à une démarche d'optimisation de la filière de traitement pour limiter la survenue de ces situations. Les informations transmises ne permettent pas de se prononcer sur l'influence d'autres éléments que la filière de traitement sur la présence des *Bacillus* observés dans l'eau traitée : intervention sur le réseau, etc.

5.3 Recommandations de gestion

Les éléments fournis dans le dossier montrent que la filière de traitement de l'usine d'Aire-sur-la-Lys n'offrait pas aux dates correspondant aux éléments fournis dans le dossier toutes les garanties d'efficacité vis-à-vis du paramètre « bactéries anaérobies sulfito-réductrices y compris les spores ». Au cas où l'efficacité de la filière n'aurait pas été améliorée, il est indispensable d'en optimiser le fonctionnement.

Références bibliographiques

Agata N, Ohta M, Mori M, Shibayama K (1999) Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiology and Immunology* 43(1), 15-18.

Amodio-Cocchieri R, Cirillo T, Villani F, Moschetti G (1998) The occurrence of *Bacillus cereus* in fast foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 49, 303-308.

Andersson A, Ronner U, Granum PE (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* 28, 145-155.

Anses (2010) Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'avis sur les mesures de gestion en santé animale et en sécurité sanitaire des aliments lors de suspicions et de confirmations de cas de fièvre charbonneuse. <http://www.anses.fr/Documents/SANT2010sa0007.pdf>

Anses (2011) *Bacillus cereus* - Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments. <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-FicheBacillusCereus.pdf>

Apetroaie-Constantin C, Mikkola R, Andersson MA, Teplova V, Suominen I, Johansson T, Salkinoja-Salonen M (2009) *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amylosin. *Journal of Applied Microbiology* 106(6), 1976-1985.

Baik KS, Lim CH, Park SC, Kim EM, Rhee MS, Seong CN (2010) *Bacillus rigui* sp. nov., isolated from wetland fresh water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2204-2209.

Baudin I, Jousset M, Debeaupuis C, Schlumberger C, Dorko J, Debreczeny L, Marchand C, Glucina K Gestion des micro et macroorganismes dans les filtres de filières de production d'eau potable. dans "Les Journées Information Eaux 2008", 2008, Poitiers

Beuchat LR, Pettigrew CA, Tremblay ME, Roselle BJ, Scouten AJ (2005) Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial fruit and vegetable sanitizer to vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32(7), 301-308.

Bottone EJ (2010) *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2), 382-398. <http://cmr.asm.org/cgi/content/abstract/23/2/382>

Brown RA, Cornwell DA (2007) Using spore removal to monitor plant performance for *Cryptosporidium* removal. *Journal. American Water Works Association* 99(3), 95-109.

Cavaglieri L, Orlando J (2005) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156(5-6), 748-754.

Choma C, Guinebretiere MH, Carlin F, Schmitt P, Velge P, Granum PE, Nguyen-The C (2000) Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 88, 617-625.

Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B (1999) *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science* 82, 305-314.

Chung j, Hijnen WAM, Vesey G, Ashbolt NJ Potential *Cryptosporidium* oocyst surrogates for sand filtration and the importance of their surface properties. dans "International Giardia and *Cryptosporidium* Conference", September 2004 2004, Amsterdam, The Netherlands,

Delmas G, Jourdan da Silva N, Pihier N, Weill F-X, Vaillant V, de Valk H (2010) Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 31-32, 344-348.

Driedger A, Staub E, Pinkernell U, Marinas B, Köster W, Gunten V (2001) Inactivation of *Bacillus Subtilis* spores and formation of bromate during ozonation. *Water Research* 35(12), 2950-2960.

(2005) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal* 175, 1-48.

(2007) Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. *The EFSA Journal* 587, Appendix B - Assessment of the *Bacillus* species. http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/sc_op_ej587_qps_en.3.pdf?ssbinary=true

(2008) The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal* 923, 1-48. http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/biohaz_op_ej923_qps_en.pdf?ssbinary=true

EFSA (2009) Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). *EFSA Journal* 7(12), 1431.

EFSA (2010) Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2010 update). *EFSA Journal* 8(12), 1944.

EFSA (2011) Technical Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. 9(11), 2445 (13pp). www.efsa.europa.eu/efsajournal

Eneroth A, Svensson B, Molin G, Christiansson A (2001) Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *Journal of Dairy Research* 68, 189-196

Euzéby JP (Ed.) (1998) 'Dictionnaire de bactériologie vétérinaire - *Bacillus anthracis* ' <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/anthracis.html>

Fasanella A, Galante D, Garofolo G, Jones MH (2010) Anthrax undervalued zoonosis. *Veterinary Microbiology* 140(3-4), 318-331.

Finch G, Kathleen B, Gyurek LL Ozone and chlorine inactivation of *Cryptosporidium*. dans "Proc. Am. Water Works Assoc. Water Qual. Technol. Conf.", November 1994 1994, San Francisco,

Francis CA, Lockley AC, Sartory DP, Watkins J (2001) A simple modified membrane filtration medium for the enumeration of aerobic spore-bearing bacilli in water. *Water Research* 35(15), 3758-3761.

From C, Hormazabal V, Granum PE (2007) Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology* 115(3), 319-324.

From C, Pukall R, Schumann P, Hormazabal V, Granum PE (2005) Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3), 1178-1183.

Glatz BA, Goepfert JM (1976) Defined conditions for synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin by fermenter-grown cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 32(3), 400-404.

Glatz BA, Goepfert JM (1977) Production of *Bacillus cereus* enterotoxin in defined media in fermenter-grown cultures. *Journal of Food Protection* 40(7), 472-474.

Granum PE, Baird-Parker TC (2000) 'Bacillus species. The microbiological safety and quality of food. ' (Aspen Publishers), 1029-1056

Guinebretiere MH, Girardin H, Dargaignaratz C, Carlin F, Nguyen-The C (2003) Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. *International Journal of Food Microbiology* 82(3), 223-232.

Hall T, Head R, Holt D (2000) UKWIR initiatives for implementing expert group recommendations to minimise *Cryptosporidium* risk in water treatment - a summary review. *Water science and technology* 41(7), 143-147.

Halverson LJ, Clayton MK, Handelsman J (1993) Population biology of *Bacillus cereus* UW85 in the rhizosphere of field-grown soybeans. *Soil Biological Biochemistry* 25, 485-493.

Halverson LJ, Handelsman J (1991) Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Appl Environ Microbiol* 57(9), 2767-2770.

Harmon SM, Kautter DA (1991) Incidence and growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. *Journal of Food Protection* 54, 372-374.

Hendriksen NB, Hansen BM (2002) Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Canadian Journal of Microbiology* 48(3), 256-261.

Hijnen WAM, Houtepen FAP, van der Speld WMN, van der Kooij D Spores of sulphite reducing clostridia : a surrogate parameter for assessing the effects of water treatment processes on protozoan (oo)cysts ? dans "Proc. Int. Symp. On waterborne *Cryptosporidium*.", March 1997 1997, Newport Beach CA, USA, pp. 115-126

Hoffmaster AR, Ravel J (2004) Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 101(22), 8449-8454.

Hong HA, Duc le H, Cutting SM (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 29(4), 813-835.

Ichimatsu T, Mizuki E, Nishimura K, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Ohba M (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Current Microbiology* 40(4), 217-220.

International Commission on Microbiological Specification for Foods (2005) 'Microbial Ecology of Food Commodities.' 2nd edition edn. (Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York) 0-306-48675-X,

Invs (2011) Maladies à déclaration obligatoires- Toxi-infections alimentaires collectives (Tiac). Données épidémiologiques. Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2009. *Dossiers Thématiques*. <http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/default.htm>

Jensen GB, Larsen P (2002) *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* 68(10), 4900-4905.

Kahn MR, Kahn SM (2002) Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. *Bioresource technology* 85, 213-215.

Kramer JM, Gilbert RJ (1989) '*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species.' 0-8247-7866-9,

Krebs BN, Hoding B, Kubart S, Workie MA, Junge H, Schmiedeknecht G, Grosch R, Bochow H, Hevesi M (1998) "Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agents" In: "Activity and characterization of *Bacillus subtilis* strains.". *Journal of Plant Disease Protection* 105, 181-197.

Larsen HD, Jørgensen K (1997) The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 34, 179-186.

Lechevallier MW Removal of Cryptosporidium and Giardia by water treatment processes. dans " Intern. Cryptosporidium and Giardia conference Amsterdam", 2004, Amsterdam, Netherlands,

Logan NA, De Vos P (2009a) Genus I. Bacillus. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. (Eds P De Vos, GM Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer and WB Whitman) pp. 21-128. (Springer: Dordrecht)

Logan NA, De Vos P (2009b) Genus IV. Brevibacillus. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. (Eds P De Vos, GM Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer and WB Whitman) pp. 305-316. (Springer: Dordrecht)

Nakamura LK (1989) Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp-nov *International Journal of Systematic Bacteriology* 39(3), 295-300.

Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM (1999) Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* subsp nov and *Bacillus subtilis* subsp *spizizenii* subsp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1211-1215.

Nieminski E (1997) From target pathogens to surrogate indicators. *Int. Symp. On Waterborne Cryptosporidium*, 243-252.

Ogbadu LJ, Okagbue RN (1988) Fermentation of african locust bean seeds : involvement of different species of *Bacillus*. . *Food microbiology* 5, 195-199.

OMS (2011) Guidelines for drinking-water quality, fourth edition. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/

Ostensvik O, From C, Heidenreich B, O'Sullivan K, Granum PE (2004) Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the B-cereus and B-subtilis groups in Norwegian surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 96(5), 987-993.

Parvathi A, Krishna K, Jose J, Joseph N, Nair S (2009) Biochemical and molecular characterisation of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Chohin, India. *Brazilian. J. Microbiol* 40, 269-275.

Pirttijarvi TS, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS (2000) Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *International Journal of Food Microbiology* 60, 231-239.

Priest FG (2009) Genus I. Paenibacillus. Bergey's manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. (Eds P De Vos, GM Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer and WB Whitman) pp. 291-295. (Springer: Dordrecht)

Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, Berkeley RCW (1987) *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37(1), 69-71.

Rice EW, K.R. F, R.J. M, A. LD, C.H. J (1996) Evaluation plant performances with endospores. Monitoring for indigenous spores of aerobic spore-forming bacteria proves a viable method of assessing treatment plant performance. *Journal American Waterworks Association* 88(9), 122-130.

Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM (1994) *Bacillus mojavensis* sp-nov, distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA-sequence, and differences in fatty-acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(2), 256-264.

Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM (1996) *Bacillus vallismortis* sp nov, a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(2), 470-475.

- Rodriguez JH, Cousin MA, Nelson PE (1992) Evaluation of anaerobic growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in tomato juice. *Journal of Food Protection* 55, 672-677.
- Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P (2005) Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Canadian Journal of Microbiology* 51(2), 149-158.
- Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kampfer P, Andersson MC, Honkanen-Buzalski T, Scoging AC (1999) Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied & Environmental Microbiology* 65(10), 4637-4645.
- Sarkar PK, Hasenack B, Nout MJR (2002) Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans and locust beans. *International Journal of Food Microbiology* 77, 175-186.
- (2000) Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Safety (SCAN) of use of *Bacillus* species in animal nutrition.
- Shane WT, Szabo JG, Bishop PL (2011) Persistence of non native spore forming bacteria in drinking water biofilm and evaluation of decontamination methods. *Environmental Technology* 32(7), 847-855.
- Sommer R, Pribil W, Pflieger S, Gehringer P, Eschweiler H, Cabaj A, Haider T Application of *Bacillus Subtilis* Spores as a measure for the efficacy of water disinfection processes. dans " Congrès IWOA ", 2002, Melbourne,
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Reviews* 32(4), 579-606.
- Svensson B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A (2004) Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal* 14, 17-27.
- Svensson B, Eneroth A, Brendehaug J, Christiansson A (1999) Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. *International Dairy Journal* 9, 903-912
- Te Giffel MC, Beumer RP, Slaghuis BA, Rombouts FM (1995) Occurrence and characterization of psychrotrophic *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. *Netherlands Milk & Dairy Journal* 49(125-138.).
- Te Giffel MC, Beumer RR, Leijendekkers S, Rombouts FM (1996) Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiology* 13, 53-58.
- Vaissaire J (1997) Le charbon bactérien : accident professionnel d'hier, et toujours présent. *Bull. Acad. Vét. de France* 70, 93-100.
- Valentino L, Torregrossa MV (1995) Risk of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infections in a burns center - The microbiological monitoring of water-supplies for a preventive strategy. . *Water Science and Technology* 31(5-6), 37-40.
- Valero M, Hernandez-Herrero LA, Fernandez PS, Salmeron MC (2002) Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiology* 19, 491-499.
- van Netten P, van de Moosdijk A, van Hoensel P, Mossel DAA, Perales I (1990) Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 73-79.
- von Stetten F, Mayr R, Scherer S (1999) Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environmental Microbiology* 1(503-515.).

Zhang T, Fan XJ, Hanada S, Kamagata Y, Fang HHP (2006) *Bacillus macauensis* sp nov, a long-chain bacterium isolated from a drinking water supply. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 349-353.

Annexe 1 : Courrier de saisine de l'Anses

ANSES Reçu le
08 JUIN 2011

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

2011 -SA- 0 1 4 7

Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé

Secrétariat d'Etat chargé de la Santé

Direction générale de la santé
Sous-direction « Prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation »
Bureau « Qualité des eaux »

Paris, le 01 JUIN 2011

DGS/EA4 – N° 235

Le Directeur général de la santé
à

Monsieur le Directeur général de l'Agence
nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail
(Anses)
Direction Evaluation des Risques (D.E.R.) -
UERE
27-31, avenue du Général Leclerc
94701 MAISONS-ALFORT Cedex

Personne chargée du dossier :
Béatrice JÉDOR
Tél. : 01.40.56.45.99
Fax : 01.40.56.50.56
Courriel : beatrice.jedor@sante.gouv.fr

Objet : évaluation des risques sanitaires liés à la présence de *Bacillus* dans l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH) délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas-de-Calais)

N/Réf. : n° 110018 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)

P.J. : une note et ses annexes

Dans le cadre de l'autosurveillance de la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH), Lille Métropole Communauté Urbaine (LMCU) a découvert des « colonies translucides atypiques » lors de la recherche des spores de bactéries sulfito-réductrices, variant de 9 à 260 UFC/100 mL dans plusieurs échantillons d'eau traitée délivrée par l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys (Nord-Pas-de-Calais). Après identification par le laboratoire IPL de Lille, il s'agit de plusieurs types de *Bacillus* (notamment, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thermoamylovorans*).

Compte-tenu du caractère pathogène ou opportuniste de ces bactéries, je souhaite que vous étudiez le risque sanitaire lié à leur présence dans l'eau destinée à la consommation humaine. L'appui du laboratoire d'hydrologie de Nancy de l'Anses pourra être sollicité en tant que de besoin. Dans ce cadre, vous voudrez bien trouver, ci-joint, une note de synthèse et ses annexes sur la situation à l'origine de la présente saisine, rédigée par l'ARS Nord-Pas-de-Calais, qui précise les éléments attendus par l'ARS.

Le dossier est enregistré par mes services sous le numéro 110018 et est intitulé comme suit :

DEMANDE D'EVALUATION DES RISQUES SANITAIRES LIES A LA PRESENCE DE BACILLUS DANS L'EAU DESTINEE A LA CONSOMMATION HUMAINE (EDCH) DELIVREE PAR L'USINE DE PRODUCTION D'EAU D'AIRE-SUR-LA-LYS (NORD-PAS-DE-CALAIS)

Copies :

- M. le DGARS du Nord-Pas-de-Calais
- M. le Directeur du LHN de l'Anses

Charles SAOUT
Adjoint à la sous-directrice
de la prévention des risques liés
à l'environnement et à l'alimentation

Annexe 2 : Constitution du dossier technique reçu

- Lettre de la DGS datée du 01/06/2011 demandant la prise en charge du dossier.
- Lettre de transmission de la société des Eaux du Nord adressée au Directeur général de l'Agence régionale de santé Nord-Pas-de-Calais datée du 13/01/2011 accompagnée de la synthèse des actions réalisées par les Eaux du Nord suite à la découverte de bactéries atypiques sur le réseau.
- Lettre de transmission de la société IPL adressée au Directeur général de l'Agence régionale de santé Nord-Pas-de-Calais datée de janvier 2011 accompagnée d'un rapport sur la question des colonies « atypiques » apparues sur le milieu TSC ainsi que la description des prélèvements et résultats des analyses.
- Lettre de transmission du Syndicat mixte d'adduction des eaux de La Lys (SMAEL) adressée au Directeur général de l'Agence régionale de santé Nord-Pas-de-Calais datée du 14/01/2011 accompagnée de l'étude de la qualité de l'eau à Prêmesques.
- Lettre de transmission de la société Lille métropole au Directeur général de l'Agence régionale de santé Nord-Pas-de-Calais datée du 31/01/2011 accompagnée de l'ensemble des éléments analytiques relatifs à la découverte de bactéries atypiques dans l'eau en provenance du réservoir de Prêmesques et de l'usine de production d'eau d'Aire-sur-la-Lys ainsi qu'une note sur l'identification de bactéries thermophiles trouvées dans les eaux de production de l'usine d'Aire-sur-la-Lys.
- Le dossier de consultation administrative : produits et procédés de traitement des eaux fourni par la société HYDRATEC daté de novembre 2010.

Annexe 3 : Démarche QPS de l'EFSA et espèces de *Bacillus* inscrites sur la liste QPS

Une grande variété d'agents biologiques – tels que des espèces bactériennes et fongiques ou des virus utilisés à des fins phytosanitaires – peuvent être autorisés dans l'Union européenne pour une utilisation dans la chaîne alimentaire humaine et animale. L'EFSA est chargée d'évaluer la sécurité d'agents biologiques notifiés dans le cadre des demandes d'autorisation. Le comité scientifique de l'EFSA a recommandé que ses groupes scientifiques adoptent la présomption d'innocuité reconnue ou QPS (*Qualified Presumption of Safety*) afin de garantir une approche cohérente. Cette approche vise à harmoniser l'évaluation des risques et à permettre aux évaluateurs des risques de se focaliser sur les micro-organismes présentant les incertitudes ou les risques les plus importants. L'innocuité d'un groupe d'agents biologiques est évaluée en fonction de quatre critères :

- la définition du groupe taxonomique (établissant l'identité du groupe) ;
- les connaissances disponibles ;
- les éventuelles inquiétudes en matière de sécurité (pathogénicité) ;
- l'utilisation finale prévue.

Si un groupe défini ne suscite pas d'inquiétude en matière de sécurité ou si toutes les préoccupations éventuelles ont pu être écartées, l'approche QPS peut s'appliquer et l'inscription de ce groupe sur la liste QPS peut alors être recommandée. Lorsqu'un agent biologique de ce groupe sera ensuite notifié à l'EFSA, il ne sera plus nécessaire, pour le groupe scientifique concerné, de procéder à l'évaluation complète de son innocuité. Les agents biologiques qui ne sont pas considérés comme adaptés à une approche QPS seront, pour leur part, soumis à une évaluation complète des risques sanitaires par le groupe scientifique responsable.

L'approche QPS est utilisée pour des micro-organismes issus de quatre grandes catégories auxquelles appartiennent la majorité des espèces notifiées à l'EFSA et pour des virus utilisés à des fins phytosanitaires :

- bactéries Gram positives non sporulantes
- espèces du genre *Bacillus*
- levures
- champignons filamenteux
- virus des familles *Potyviridae* et *Baculoviridae* (depuis 2009)

Selon l'avis de l'EFSA du 19 Novembre 2007 (EFSA, 2007)

- *B. licheniformis* et *B. coagulans* sont proposés pour une introduction dans la liste QPS, mais à la condition d'avoir vérifié l'absence de production de toxines comme pour toutes les espèces de *Bacillus* introduites dans la liste QPS ;
- *B. cereus* ne doit pas être introduit dans la liste QPS, compte tenu de l'abondante littérature à son sujet indiquant une forte proportion de souches pathogènes.

Selon l'annexe B de l'avis de l'EFSA du 19 Novembre 2007 (EFSA, 2007) :

Le présent document concerne les espèces du groupe *B. subtilis* qui sont, ou étaient précédemment classées comme *B. subtilis* (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. subtilis* et *B. vallismortis*), sélectionne des espèces dans le groupe des ***B. cereus*** (*B. cereus*, *B. mycoïdes*, *B. pseudomycoïdes*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*), suite à une amélioration des connaissances relatives à ces deux groupes. D'autres espèces également notifiées à l'EFSA, et pour lesquelles des connaissances suffisantes existent, sont également considérées (*B. clausii*, *B. coagulans*, *B. fusiformis*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* et *Geobacillus stearothermophilus*).

Ces différentes espèces peuvent être identifiées en utilisant la séquence d'rARN 16S. La séquence du gène *gyraseA* permet d'identifier les espèces du groupe des *B. subtilis* (Chung

et al., 2004). Les espèces du groupe des *B. cereus* sont plus difficiles à identifier correctement. Cependant, les bactéries du groupe des *B. cereus* ne synthétisent pas de protéine cristal parasporal et peuvent ainsi se distinguer des crystallifères *B. thuringiensis*.

Différentes espèces de *Bacillus* - *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* et *B. cereus* (excluant *B. anthracis*) sont utilisées comme probiotiques, aliment pour animaux, ou dans l'aquaculture (Hong et al., 2005; SCAN, 2000). En outre, différentes espèces de *Bacillus* sont impliquées dans la préparation de plats fermentés traditionnels en Afrique et en Asie (Sarkar et al., 2002). *B. thuringiensis*, qui fait partie du groupe des *B. cereus* et est caractérisé par la production d'une protéine toxique pour les insectes est utilisé depuis longtemps pour la protection des plantes. Des espèces de *B. cereus* (Halverson et Handelsman, 1991) et de *B. subtilis* (Cavaglieri et Orlando, 2005; Kahn et Kahn, 2002; Krebs et al., 1998) sont utilisées pour le traitement de graines et de racines pour protéger ou promouvoir la croissance des plantes. Différentes espèces de *Bacillus*, comme *Geobacillus stearothermophilus*, est une source majeure d'enzymes commerciales (SCAN 2000).

Certaines de ces espèces de *Bacillus*, sont connues comme agents toxiques pour l'alimentation (Granum et Baird-Parker, 2000; Kramer et Gilbert, 1989). *B. cereus* and *B. thuringiensis* sont à l'origine d'intoxications alimentaires. Des *B. thuringiensis*, identiques à ceux présents dans des produits de protections des plantes, ont été isolés des échantillons de fèces d'individus travaillant dans des exploitations utilisant ces produits (Jensen et Larsen, 2002).

Des souches de *B. fusiformis*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, et *B. subtilis* peuvent également exceptionnellement provoquer des intoxications alimentaires (Kramer 1989). Certaines de ces espèces produisent des produits cytotoxiques (From et al., 2005; Salkinoja-Salonen et al., 1999). Des souches d'autres espèces ont été recensées comme produisant des toxines similaires à celles de *B. cereus*, mais l'identification des bactéries réalisée dans le cadre de ces études est incertaine (*B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. lentimorbis*, *B. lentus*, and *B. megaterium*).

Par ailleurs, aucun problème sanitaire lié à l'utilisation volontaire de bactéries du genre *Bacillus* pour l'alimentation n'a été recensé.

Bacillus anthracis est l'une des bactéries les plus toxiques, qui cause l'anthrax chez l'Homme et les animaux, et qui fait partie du groupe des *Bacillus cereus*. D'autres membres de ce groupe portant les gènes encodant pour des toxines similaires à l'anthrax ont déjà été observées (Hoffmaster et Ravel, 2004).

Comme toutes les espèces énumérées possèdent potentiellement des traits toxiques, l'absence d'activité toxique doit être vérifiée pour leur qualification.

Les *Bacillus* spp appartenant au groupe des *Bacillus cereus* (*B. cereus sensu stricto*, *B. mycoïdes*, *B. pseudomycoïdes*, *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*) ne sont pas proposées pour la démarche QPS, car la majorité des bactéries de ce groupe sont maintenant connues comme productrices de toxines et ne peuvent être classées dans la liste QPS.

Selon l'avis de l'EFSA du 10 décembre 2008 (EFSA, 2008)

Les *Bacillus* spp autres que *Bacillus cereus* sont rarement à l'origine d'intoxications alimentaires dues à la production de toxines par certaines souches. Le Statut QPS des espèces de *Bacillus* listées dans les précédents avis de l'EFSA (EFSA, 2007) est maintenu, avec la qualification « absence de toxines empoisonnant les aliments, absence d'activité surfactante, absence d'activité entérotoxique ». Aussi, l'absence de la capacité à produire des protéines ou des peptides avec des activités entérotoxiques ou cytotoxiques a été proposée comme bases d'une qualification en QPS pour les *Bacillus* spp autres que *B. cereus* dans les précédents avis de l'EFSA (EFSA, 2007). Cependant, il reste possible que de nouveaux facteurs de virulence, non pris en compte par les qualifications proposées, puissent être découverts et doivent faire l'objet d'une attention particulière. Les *Bacillus* spp

causent également des quelques infections locales ou systémiques qui doivent faire l'objet d'une surveillance.

Les publications parues depuis le dernier avis de l'EFSA donnent plus d'indications sur la nature de certaines toxines produites par des espèces de *Bacillus* QPS.

Bacillus thuringiensis, un membre du groupe des *B. cereus*, dont certaines souches sont utilisées comme agents de protection des plantes, n'est pas inclus dans la liste QPS.

Les connaissances sur les effets, sur la santé des consommateurs, de l'utilisation intentionnelle de *B. circulans* et *B. firmus* dans la chaîne alimentaire, ne sont pas suffisantes pour justifier le statut QPS.

Selon un avis de l'EFSA de 2009 (EFSA, 2009)

Aucune nouvelle toxine produite par *Bacillus* spp et qui pourrait être impliquée dans des intoxications alimentaires n'a été identifiée depuis le précédent avis de mise à jour de la liste QPS (EFSA, 2008).

Une publication décrit une souche de *Bacillus pumilus* isolée dans les sols, qui porterait le gène codant pour la synthèse de céréulide, la toxine émétique de *B. cereus* (Parvathi *et al.*, 2009). Malgré tout, les connaissances actuelles, notamment l'absence de signalement d'intoxication alimentaire causée par *Bacillus pumilus*, ne justifient pas son exclusion de la liste QPS.

En conclusion, compte tenu des publications actuellement disponibles, aucune modification de la liste QPS concernant les *Bacillus* spp, telle que décrite dans l'avis de l'EFSA de 2008, n'est justifiée.

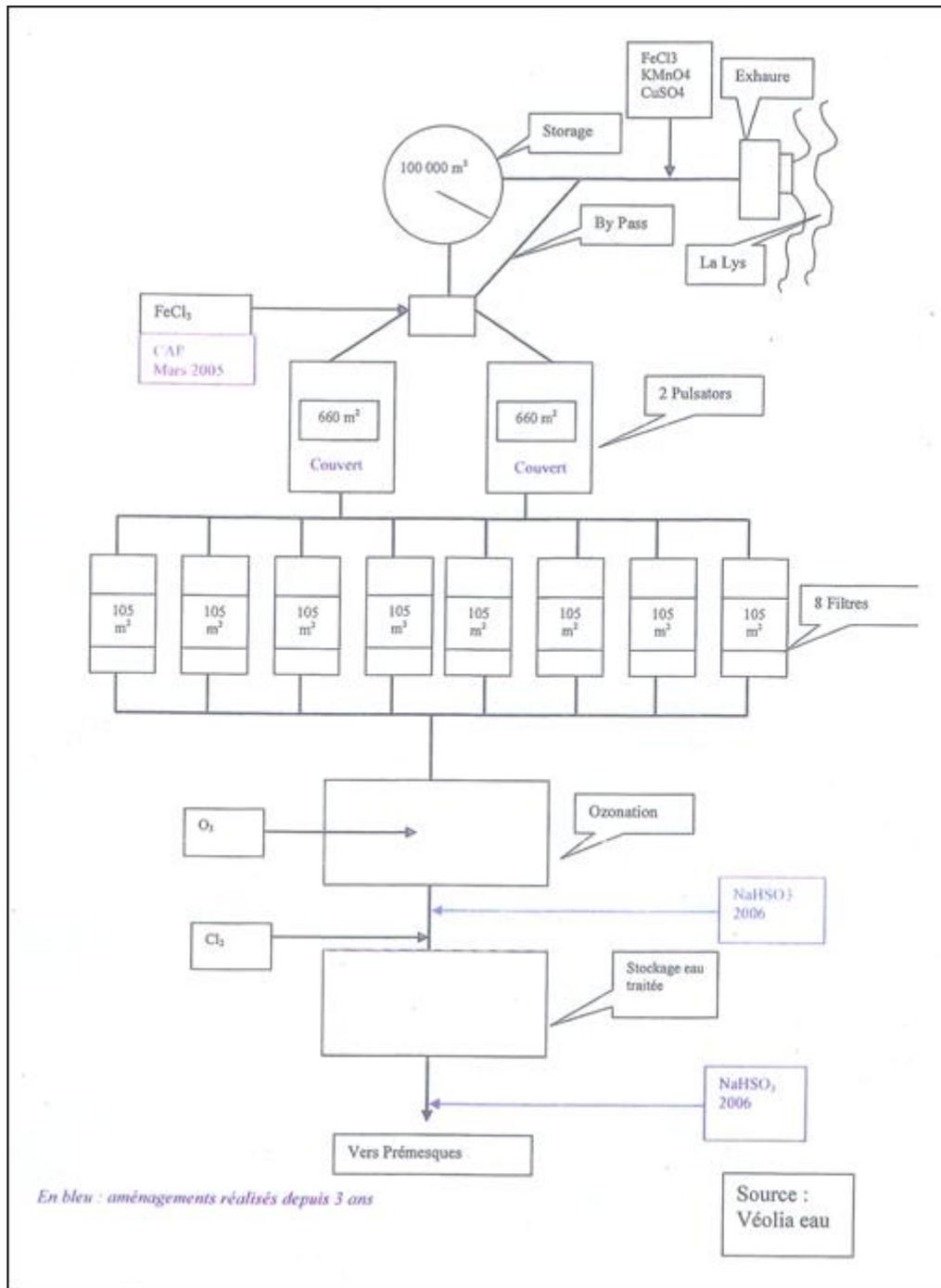
Selon un avis de l'EFSA de 2010 (EFSA, 2010)

L'absence de la capacité à produire des protéines ou des peptides avec des activités entérotoxiques ou cytotoxiques a été proposées comme bases d'une qualification en QPS pour les *Bacillus* spp autres que *B. cereus* dans les précédents avis de l'EFSA (EFSA, 2007). Le Statut QPS des espèces de *Bacillus* listées dans les précédents avis de l'EFSA (EFSA, 2007; EFSA, 2008; EFSA, 2009) avait été associés à la qualification « absence de toxines empoisonnant les aliments, absence d'activité surfactantes, absence d'activité entérotoxique ». Compte tenu de l'amélioration des connaissances, cette qualification est remplacée par « absence de potentiel toxique ». Cela inclut les toxines produites dans les aliments et les entérotoxines produites dans le tractus digestif. La référence à l'activité surfactante avait été introduite en 2007, dans l'hypothèse qu'elle fournisse une indication sur la production de toxines alimentaires. Les connaissances les plus récentes montrent que cette hypothèse n'était pas fondée.

Par ailleurs, compte tenu des publications actuellement disponibles, aucune modification de la liste QPS concernant les *Bacillus* spp, telle que décrite dans l'avis de l'EFSA de 2008, n'est justifiée.

Bacillus brevis (maintenant appelé *Aneurinibacillus* spp ou *Brevibacillus* spp), *Bacillus firmus*, *Bacillus circulans* ont été précédemment évalués (EFSA, 2008; EFSA, 2009) et ne sont pas recommandés pour la liste QPS car quelques inquiétudes de sécurité ont été identifiées pour certains souches de ces espèces (production d'antibiotiques, rapport d'infection humaine, production de toxines potentielles) et car les connaissances actuelles sur leur utilisation dans la chaîne alimentaire ne sont pas suffisantes. Ces espèces ne seront pas réévaluer pour une éventuelle entrée dans la liste QPS à moins qu'elles soient à nouveau notifiées à l'EFSA.

Annexe 4 : Schéma de principe de la filière de traitement d'Aire-sur-la-Lys



Annexe 5 : Précisions concernant *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis a été mis en évidence au 19^{ème} siècle par Koch (1876). Il est responsable du charbon bactérien (autrement appelée la fièvre charbonneuse, la maladie charbonneuse, le charbon ou, en anglais, l'anthrax), une maladie mondialement répandue, atteignant de nombreuses espèces animales domestiques ou sauvages et transmissible à l'homme. Le charbon bactérien est inscrit sur la liste B de l'OIE (Office international des épizooties). En France, la fièvre charbonneuse des mammifères de toutes les espèces est une maladie qui donne lieu à déclaration et à l'application de mesures sanitaires (Décret n° 65-697 du 16 août 1965). En raison du risque d'infection pour l'Homme, *Bacillus anthracis* est classé parmi les bactéries présentant un niveau de risque 3 (Euzéby, 1998; Fasanella *et al.*, 2010).

Le charbon n'a plus une importance économique majeure dans de nombreux pays développés même si quelques foyers sont susceptibles d'apparaître occasionnellement. En revanche, l'infection est endémique dans le cheptel des pays de l'Est, du pourtour méditerranéen, de l'Asie du Sud Est, d'Afrique et d'Amérique du Sud. Le nombre de cas humains est estimé par l'OMS entre 100 000 et 200 000 par an (Euzéby, 1998).

Selon Vaissaire *et al.*, les risques de voir apparaître des cas de charbon chez l'Homme et l'animal dans les pays développés sont liés aux facteurs suivants (Vaissaire, 1997) :

- abandon de la vaccination animale dans certaines régions ;
- moins bonne connaissance de la maladie par les jeunes vétérinaires et les jeunes éleveurs ;
- raisons économiques qui conduisent à ne pas rechercher de manière systématique les causes de la mort lorsque la mortalité apparaît sporadique ;
- non-enlèvement des carcasses par l'équarrisseur lors de mort d'étiologie non définie et, tout particulièrement, non-enlèvement des carcasses des petits ruminants en raison du coût ;
- oubli de l'emplacement exact des "champs maudits" ;
- réintroduction de certains rapaces comme les vautours, insensibles au charbon mais capables de disséminer les spores (principalement dans leurs fèces) et nourris avec des carcasses non contrôlées ;
- reprise des enfouissements clandestins dans certaines régions ;
- reprise des abattages clandestins avec consommation familiale de la viande ou consommation de la viande entre voisins et amis.

Selon le mode de contamination, le charbon peut être interne (ingestion ou inhalation de spores) ou externe (inoculation des spores au travers de la peau et des muqueuses). Le charbon interne est une maladie redoutable et d'évolution rapide (Euzéby, 1998).

La transmission vectorielle de l'infection par des insectes hématophages (Stomox, *Aedes*, Tabanidés) est également possible. Elle conduit à de nombreux cas de charbon externe et entraîne une transmission entre espèces animales ou une transmission de l'animal à l'Homme (Fasanella *et al.*, 2010).

Du fait de la gravité de l'infection et de la relative facilité à disséminer les spores, *Bacillus anthracis* est une des bactéries qui a fait l'objet de tentatives d'utilisation pour la guerre bactériologique ou pour des actes de terrorisme (Fasanella *et al.*, 2010).

Charbon animal

La sensibilité des animaux à cette bactérie varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Les herbivores et en particulier les ruminants sont à la fois les plus exposés et les plus sensibles à l'infection, mais les omnivores (notamment les porcs) et moins fréquemment les carnivores sont susceptibles d'être infectés. L'infection des animaux sauvages (tels que les bisons ou les éléphants) peut conduire secondairement à des cas d'infections chez les animaux domestiques (Euzéby, 1998; Fasanella *et al.*, 2010).

Les formes aiguës ou septicémiques sont classiques chez les Équidés et les Bovidés et elles **résultent, le plus souvent, de l'ingestion de spores**. Elles débutent par une atteinte brusque de l'état général puis, en 12 à 24 heures, on note une dyspnée, une accélération du rythme cardiaque, une congestion suivie d'une cyanose des muqueuses, des pétéchies, souvent des coliques et des diarrhées sanguinolentes et, plus tardivement, des hémorragies vésicales. La mort intervient en 1 à 3 jours chez les bovins et en 3 à 6 jours chez les équidés (Euzéby, 1998).

Les formes suraiguës, fréquentes chez les petits ruminants, se traduisent par des symptômes similaires mais plus prononcés et par une mort rapide en quelques heures. Ces formes suraiguës sont également observées chez les bovins et les chevaux : les animaux meurent brutalement et présentent parfois des saignements localisés aux orifices naturels (Euzéby, 1998).

Les formes externes s'observent chez les Suidés et les carnivores et parfois chez les herbivores. Elles sont toutefois exceptionnelles chez les ovins. Elles consistent dans le développement d'une masse œdémateuse (la tumeur charbonneuse), localisée autour des nœuds lymphatiques superficiels drainant le point d'inoculation des spores. L'œdème s'étend aux régions adjacentes, une septicémie apparaît en 12 à 48 heures et l'infection évolue vers un charbon interne (Euzéby, 1998).

Les lésions, pratiquement identiques chez toutes les espèces, sont caractéristiques (Euzéby, 1998) :

- sang noirâtre, épais et incoagulable ;
- splénomégalie importante avec une pulpe de consistance boueuse ;
- hémorragies vésicales et rénales ;
- congestion et parfois hémorragies intestinales ;
- tumeur charbonneuse interne ou externe.

De plus, le cadavre ne présente pas une rigidité complète et il se décompose très rapidement (Euzéby, 1998).

Charbon humain

Chez l'Homme, le charbon est souvent une maladie professionnelle, sévissant aussi bien en zone rurale qu'en zone urbaine et **résultant, le plus souvent, de la manipulation d'animaux morts de charbon ou de leurs produits**. Les principales professions exposées sont les éleveurs, les vétérinaires, les ouvriers d'abattoir, les équarisseurs, les bouchers, les tanneurs, les ouvriers travaillant les os (fabrication de gélatine), les poudres d'os, les poudres de sang, la laine ou les autres phanères d'origine animale, les dockers manipulant les poudres d'os, les employés des entreprises de travaux publics (percement de routes ou d'autoroutes et autres travaux de terrassements), les artisans travaillant l'ivoire, les personnels de laboratoire. **La consommation de viandes mal cuites, provenant d'animaux morts de charbon, est également à l'origine de cas humains notamment**, dans les pays en voie de développement. Les **risques liés à la consommation de lait contaminé sont considérés comme faibles**, mais l'excrétion dans le lait se produit au moment de la septicémie et, en cas de guérison, elle peut se poursuivre pendant plusieurs semaines (Euzéby, 1998).

Le charbon humain se présente sous trois formes reflétant la voie de contamination : une forme cutanée, le charbon d'inhalation et le charbon d'ingestion. Chacune de ces trois formes est susceptible de se compliquer en méningite ou de septicémie très graves (Euzéby, 1998).

La forme cutanée est la plus fréquente et représente 90 à 95 % des cas de charbon chez l'homme. Elle résulte de la contamination d'une plaie ou d'une simple abrasion cutanée par des spores. Elle se traduit après 2 à 5 jours d'incubation (avec des extrêmes allant de 12 heures à 2 semaines) par l'apparition d'une papule rouge puis d'une vésicule prurigineuse avec un œdème envahissant les tissus voisins puis laissant place à une escarre noirâtre (à l'origine du nom de la maladie) qui progresse de façon centrifuge. Dans 80 à 90 % des cas, la guérison est spontanée. Dans les formes sévères, on note une adénite régionale et parfois une septicémie fréquemment mortelle en l'absence de traitement (Euzéby, 1998).

Le charbon d'inhalation ou charbon pulmonaire résulte de l'inhalation de spores (cette forme était fréquente chez les ouvriers travaillant la laine). La forme clinique associe des signes généraux et respiratoires, elle se complique en médiastinite hémorragique et d'hémoptysie et, en l'absence de traitement, son évolution est mortelle dans plus de 95 % des cas (Euzéby, 1998).

Le charbon d'ingestion ou charbon gastro-intestinal, rare dans les pays développés, se traduit par des troubles généraux (fièvre, état de choc) et digestifs (douleurs abdominales, vomissements, diarrhée sanglante) qui apparaissent après une incubation de 2 à 7 jours. Comme pour le charbon pulmonaire, le taux de mortalité est élevé (Euzéby, 1998; Fasanella *et al.*, 2010).

Annexe 6 : Exemples d'incidences de *B. cereus* dans différents aliments (EFSA 2005)

Food categories	% of positive samples (limit of detection cfu g ⁻¹)	Numbers of <i>B. cereus</i> in positive samples (cfu g ⁻¹ or ml ⁻¹)	References
Spices	42 % (10 ²)	most samples < 10 ⁴ - few samples >10 ⁴	(van Netten <i>et al.</i> , 1990)
Herbs and spices	100% (10 ²)	10 ² to 10 ⁶	(Te Giffel <i>et al.</i> , 1996)
Ready to eat chilled foods in self service restaurants	6 to 21% (all categories positive: vegetables, rice, pasta, meat and fish)	10 ³ to 10 ⁵	(Amodio-Cocchieri <i>et al.</i> , 1998)
Fresh vegetables	0 to 100% (10)	10 ² to 8 x 10 ³	(Valero <i>et al.</i> , 2002)
Vegetable salads	2 % (10 ²)	< 10 ³	(van Netten <i>et al.</i> , 1990)
Cooked chilled foods (unstored)	0% (10)	< 10	(Choma <i>et al.</i> , 2000)
(stored at 4°C until use by date)	0% (10)	< 10	
(stored at 10°C until use by date)	0 to 100%	10 ⁴ to 10 ⁶	
Flour	55% (10 ²)	10 ³	(Te Giffel <i>et al.</i> , 1996)
Liquid egg yolk pasteurised	24% (10 ²)	< 10 ³	(van Netten <i>et al.</i> , 1990)
Bakery product	90% (10 ²)	10 ³ to 10 ⁴	(Te Giffel <i>et al.</i> , 1996)
Pasteurised milk after storage at 7°C until "best before" date	8% (10 ²)	From < 10 ³ to > 10 ⁵	(van Netten <i>et al.</i> , 1990)
Pasteurised milk after 8 days at 7°C	56% (10)	From 10 ³ to 3 x 10 ⁵	(Larsen et Jørgensen, 1997)
Milk powder	27% (10)	4 spores g ⁻¹ (mean), up to 40 spores g ⁻¹	(van Netten <i>et al.</i> , 1990)
Powdered infant formulae	75% (0.04)	0.04 to 1 MPN g ⁻¹	(Harmon et Kautter, 1991)



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr