



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

RISQUES LIÉS À LA PRÉSENCE DE MOISSURES ET LEVURES DANS LES EAUX CONDITIONNÉES

Août 2009

Composition du groupe de travail	5
Liste des sigles et acronymes	6
Glossaire	7
Introduction	9
1 Généralités sur les moisissures et les levures	10
1.1 <i>Présentation des moisissures et des levures</i>	10
1.1.1 Moisissures	10
1.1.2 Levures	10
1.2 <i>Connaissances relatives aux moisissures et levures dans les eaux (autres que eaux conditionnées)</i>	11
1.2.1 Moisissures et levures présentes dans les eaux de surface et souterraines	11
1.2.2 Moisissures et levures présentes dans les eaux destinées à la consommation humaine fournies par un réseau de distribution	11
1.2.3 Présence de mycotoxines dans les eaux	12
1.2.4 Dégradation des caractères organoleptiques.....	12
2 Moisissures et levures présentes dans les eaux conditionnées	13
2.1 <i>Réglementation relative aux moisissures et levures dans les eaux conditionnées</i>	13
2.2 <i>Contamination des eaux conditionnées en France</i>	13
2.3 <i>Contamination des eaux conditionnées à l'étranger</i>	14
2.4 <i>Dégradation des caractères organoleptiques</i>	15
3 Survie et croissance des moisissures et levures dans les eaux conditionnées	17
3.1 <i>Survie et croissance des moisissures dans les eaux minérales ou minéralisées</i>	17
3.1.1 Influence de l'espèce de moisissure et de la composition minérale de l'eau	17
3.1.2 Influence de la composition gazeuse de l'eau.....	17
3.1.3 Influence du matériau de conditionnement	17
3.2 <i>Survie et croissance des levures dans l'eau</i>	18
3.3 <i>Effet des désinfectants sur les populations de moisissures et de levures</i>	18
3.3.1 Réglementation.....	18
3.3.2 Effets des désinfectants	19
4 Méthodes de détection des moisissures et levures dans les eaux	21
4.1 <i>Méthodes de détection par culture</i>	21
4.1.1 Méthodes décrites dans les articles scientifiques ou utilisées dans les laboratoires d'analyse des eaux.....	21
4.1.2 Méthodes normalisées	22
4.2 <i>Méthodes de biologie moléculaire</i>	23
5 Origine et maîtrise des contaminations fongiques dans les entreprises de production d'eaux conditionnées	25
5.1 <i>Transfert des moisissures de l'eau dans l'air et de l'air dans l'eau</i>	25
5.1.1 Passage eau / air	25
5.1.2 Passage air / eau.....	25

5.2	Mesures de gestion	25
6	Évaluation des risques associés à l'ingestion d'eau contaminée par des moisissures et des levures	27
6.1	Identification des dangers.....	27
6.1.1	Moisissures.....	27
6.1.2	Mycotoxines.....	27
6.1.3	Levures	27
6.1.4	Molécules à l'origine de la dégradation des caractères organoleptiques.....	28
6.2	Exposition	28
6.3	Caractérisation des risques	28
6.3.1	Risques d'infection par les moisissures et les levures	28
6.3.2	Risques d'intoxication aux mycotoxines	28
7	Conclusion et recommandations.....	30
7.1	Acquisition de données et recommandations de recherche	30
7.2	Recommandations de mesures de gestion.....	31
	Références bibliographiques	32
	Annexes.....	36
	<i>Annexe 1 : Mycotoxines et moisissures productrices associées, retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Afssa, 2009).....</i>	<i>36</i>
	<i>Annexe 2 : Effets des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés (Afssa, 2009).....</i>	<i>37</i>
	<i>Annexe 3 : Genres et espèces de moisissures filamenteuses retrouvés dans les eaux</i>	<i>38</i>
	<i>Annexe 4 : Genres et espèces de levures retrouvés dans les eaux.....</i>	<i>42</i>
	<i>Annexe 5 : Présence de moisissures et levures dans les eaux de surface ou souterraines : résumé des publications.....</i>	<i>43</i>
	<i>Annexe 6 : Présence de moisissures et levures dans les eaux destinées à la consommation humaine fournies par un réseau de distribution : résumé des publications</i>	<i>45</i>
	<i>Annexe 7 : Synthèse des méthodes décrites dans la littérature pour la recherche des moisissures et des levures dans les eaux.....</i>	<i>50</i>
	<i>Annexe 8 : Composition des différents milieux utilisés pour la recherche des moisissures et levures</i>	<i>53</i>

Composition du groupe de travail

- **Experts :**

M. Philippe HARTEMANN, président

Université Henri Poincaré, Nancy 1
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

M. Benoît GASSILLOUD

Laboratoire d'études et de recherches en hydrologie de l'Afssa, Nancy
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

Mme Isabelle JOLY

Centre hospitalier de Dunkerque
Centre hospitalier régional universitaire de Lille
Université de Lille 2

Mme Claire LACROIX

Université Denis Diderot, Paris 7
Hôpital saint Louis, Paris

M. Yves LÉVI

Université Paris Sud 11
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

- **Coordination scientifique :**

Mme Pascale PANETIER

Afssa - Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires
Responsable de l'unité d'évaluation des risques liés à l'eau

Melle Perrine PAYEN

Afssa - Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires
Unité d'évaluation des risques liés à l'eau

M. Rémi POIRIER

Afssa - Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires
Unité d'évaluation des risques liés à l'eau

- **Ont été auditionnés :**

Mmes Annick MOREAU et Myriam PARIS, au titre de représentantes du syndicat des producteurs d'eau minérale naturelle

M. Thierry VINAY, au titre de représentant du syndicat des producteurs d'eau de source

- **Relecteurs du rapport du Comité d'expert spécialisé « Eaux » :**

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT

Faculté de Pharmacie – Université d'Auvergne
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

M. Jean-Luc POTELON

École des hautes études en santé publique, Rennes
Comité d'experts spécialisé « Eaux »

Liste des sigles et acronymes

AFNOR	: Association française de normalisation
Afssa	: Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AQR	: Appréciation quantitative du risque
AME	: Alternariol methyl ether
AOH	: Alternariol
AST	: Appui scientifique et technique
ATCC	: American type culture collection
Aw	: Activity water
BCP	: Bromocrésol pourpre
CMA/2	: Corn meal agar half-strength
COT	: Carbone organique total
CSE	: Contrôle sanitaire des eaux
DBP	: Di-n-butyl phtalate
DGS	: Direction générale de la santé
DLUO	: Date limite d'utilisation optimale
DOM-TOM	: Départements et territoires français d'outre-mer
EDCH	: Eau destinée à la consommation humaine
ERS	: Évaluation des risques sanitaires
GBPH	: Guide de bonnes pratiques d'hygiène
HACCP	: Hazard analysis critical control point
IBWA	: International bottled water association
LERH	: Laboratoire d'études et de recherches en hydrologie
MEA	: Malt extract agar
NGRBA	: Neopeptone glucose rose Bengal aureomycin
OSM	: Oomycete selective medium
PCR	: Polymerase chain reaction
PDA	: Potato dextrose agar
PET	: Polyéthylène téréphtalate
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
SDA	: Sabouraud dextrose agar
TWA	: Tap water agar
UFC	: Unité formant colonie
UI	: Unité internationale
UV	: Ultraviolets
YGC	: Yeast extract glucose chloramphenicol agar
YMG	: Yeast extract malt glucose agar

Activité de l'eau (a_w) d'une solution ou d'un solide : représente la pression de vapeur de cette solution ou de ce solide sur la pression de vapeur de l'eau pure.

L'activité de l'eau est employée pour représenter la disponibilité de l'eau d'un milieu et peut être réduite par interaction avec les molécules de soluté (effet osmotique) ou par absorption sur les surfaces de solides (effet matrice).

Conidie : terme désignant une spore externe assurant la reproduction végétative des champignons.

Droplet nuclei : noyau plus ou moins solide résultant de l'assèchement d'une gouttelette.

Endogène (infection) : infection causée par un (ou des) micro-organisme(s) portés ou vivant naturellement chez un individu.

Endosaprophyte : se dit d'un micro-organisme (champignon notamment) appartenant à la flore endogène d'un hôte (muqueuses et cavités naturelles de l'Homme et de l'animal) et vivant aux dépens de son hôte sans y provoquer de maladie (ex : *Candida albicans* : saprophyte du tube digestif).

Épisaprophyte : se dit d'un micro-organisme (champignon notamment) vivant et se développant sur la peau de l'Homme et de l'animal sans y provoquer de maladie.

Exosaprophyte : se dit d'un micro-organisme vivant dans le milieu extérieur à l'état saprophytique, c'est à dire en se nourrissant de matières organiques en décomposition.

Eucaryote : classe de cellules disposant d'une membrane nucléaire séparant le noyau du cytoplasme.

Flaveur : goût et odeur d'un aliment.

Hétérotrophe : qualifie un organisme qui utilise principalement des molécules organiques comme sources de carbone.

Hyphes : filaments ou mycélium des champignons, à structure cellulaire.

Levure osmophile ou moisissure xérophile : champignon capable de se développer dans un milieu dont l' a_w est inférieure ou égale à 0,95 (définition de la norme NF ISO 21527).

Mésophile : qualifie un micro-organisme dont la température optimale de croissance est comprise entre 20°C et 45°C.

Microbiostatique (agent) : agent qui inhibe réversiblement la croissance et la multiplication de micro-organismes (bactéries, moisissures, protozoaires, virus) : si l'agent est éliminé, les micro-organismes peuvent retrouver leur compétence à se multiplier.

Microbicide (agent) : agent physique ou chimique capable d'inactiver ou de tuer un micro-organisme cible. Son activité est liée à la concentration et au temps de contact, ainsi qu'aux interférences avec la matrice autour du micro-organisme. Dans certains cas, aux faibles concentrations, il peut être uniquement microbiostatique.

Micro-organisme revivifiable : toute bactérie aérobie, levure ou moisissure, capable de former des colonies dans le milieu spécifié et dans les conditions d'essai décrites dans la norme NF EN ISO 6222, à savoir après incubation 44 h (\pm 4 h) à 36°C (\pm 2°C) et 68h (\pm 4 h) à 22°C (\pm 2°C) dans une gélose nutritive.

Neutropénique (patient) : patient dont le nombre de globules blancs polynucléaires neutrophiles est inférieur aux valeurs normales.

Oncologique : relatif au traitement des cancers.

Probiotique : administration orale soit de micro-organismes vivants, soit de substances favorables à la croissance de micro-organismes, dans le but de rééquilibrer la balance de la microflore naturelle, généralement du tube digestif et de rétablir une fonction normale.

Séquençage d'un ADN : détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

Spore : élément unicellulaire capable de multiplication végétative (asexuée) ou de reproduction sexuée, produit par de nombreuses plantes, algues, champignons, bactéries ou certains protozoaires. Chez certains micro-organismes (bactéries, champignons, parasites) elles sont une forme de résistance dans l'environnement et permettent la dispersion de l'espèce.

sp. (indiqué après le genre d'un micro-organisme) : abréviation de *species* au singulier, utilisée pour indiquer une espèce particulière du genre mais non déterminée.

spp. (indiqué après le genre d'un micro-organisme) : abréviation de *species* au pluriel pour indiquer toutes les espèces du genre.

Stérilisation : au sens de la pharmacopée, procédé d'inactivation des micro-organismes dans un conditionnement étanche à une recontamination extérieure, garantissant que moins d'un objet stérilisé sur un million soit encore susceptible de contenir un micro-organisme cultivable selon la méthode la plus sensible.

Thalle : Appareil végétatif des végétaux inférieurs (algues, champignons, lichens, *etc.*), dépourvus de feuille, de racine et de tige.

Thermophile : qualifie un micro-organisme pouvant se développer à la température de 55°C voire plus et dont la température optimale de croissance est souvent comprise entre 55 et 65°C.

Thermotolérant : qualifie un micro-organisme capable de résister à de fortes températures et de se développer à des températures plus élevées que les températures classiques en microbiologie. L'optimum peut se situer entre 40 et 50 °C.

En juin 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie par la Direction générale de la santé (DGS) après la mise en évidence de moisissures dans des eaux conditionnées, ayant conduit une société du Vaucluse à interrompre sa production et à arrêter la commercialisation.

L'exploitant a mis en œuvre des mesures correctives (amélioration des filtrations d'air et d'eau, révision et renforcement des procédures de nettoyage et de désinfection notamment), un contrôle analytique renforcé et a procédé à une recherche spécifique de moisissures. Un protocole a été établi pour autoriser la libération des lots produits, basé notamment sur le dénombrement de moisissures dans les eaux conditionnées.

L'avis de l'Afssa a été demandé par la DGS, sur :

- le protocole proposé pour la libération des lots ;
- les seuils en moisissures et en levures à retenir permettant de juger du retour à une situation normale pour des eaux conditionnées, compte tenu notamment :
 - o de la mise en œuvre d'un traitement de déferrisation,
 - o des valeurs en moisissures et levures habituellement rencontrées dans les eaux traitées ;
- l'intérêt d'une identification des différentes espèces de ces micro-organismes, pour une éventuelle adaptation de la gestion en fonction des risques sanitaires que présentent chacune d'entre elles.

La demande a été scindée par l'Afssa en deux questions scientifiques :

- une demande d'appui scientifique et technique (AST) relatif à l'identification de valeurs seuils pour les moisissures et les levures permettant d'estimer que l'eau embouteillée par la société en question n'est pas contaminée par une flore exogène.

Cet AST a été traité par le laboratoire d'études et de recherches en hydrologie (LERH), dont le rapport a été transmis à la DGS en octobre 2007. La valeur seuil mentionnée dans cet AST a été déterminée par la société et validée par le LERH essentiellement dans un but opérationnel, pour la libération des lots d'eaux embouteillées.

- une demande d'avis plus général, relatif à la présence de moisissures et levures dans les eaux embouteillées, dont le présent rapport fait l'objet.

Un groupe de travail intitulé « Moisissures et levures présentes dans les eaux embouteillées » a donc été créé dans le but d'évaluer les risques, la pertinence et la faisabilité de définir des seuils pour ces micro-organismes dans les eaux conditionnées.

Le champ de la saisine, qui concernait initialement les eaux embouteillées, a été élargi aux eaux conditionnées afin que les contenants autres que les bouteilles soient pris en compte.

Par ailleurs, les données sur les moisissures et les levures présentes dans les eaux conditionnées étant peu nombreuses, la présence de ces micro-organismes dans les ressources en eaux brutes et les eaux destinées à la consommation humaine a aussi été étudiée.

Il est de plus important de souligner que sous l'appellation « eaux conditionnées » sont regroupées les eaux de sources, les eaux minérales naturelles ainsi que les eaux rendues potables par traitement. Selon la réglementation française, les eaux aromatisées sortent du cadre réglementaire applicable aux eaux destinées à la consommation humaine. Elles ne sont pas considérées comme des eaux, mais comme des boissons conditionnées à base d'eau qui dépendent de la réglementation relative aux aliments. Ainsi, même s'il n'est pas exclu que l'ajout d'additifs ou de sucres soit à l'origine de contaminations ou de développements de moisissures et levures, les boissons à base d'eau ne seront pas abordées dans ce rapport.

1 Généralités sur les moisissures et les levures

1.1 Présentation des moisissures et des levures

Les moisissures et les levures sont des champignons microscopiques (micromycètes). Ce sont des organismes eucaryotes constitués soit d'éléments unicellulaires, soit de filaments isolés ou agrégés et se reproduisent par l'intermédiaire de spores. Ces organismes sont hétérotrophes : ils vivent donc aux dépens de matières organiques préformées.

Les champignons sont capables de résister à des conditions environnementales très défavorables et se développent sur des milieux simples contenant une source de glucose, une source d'azote et quelques sels minéraux. Leur température optimale de croissance varie selon les espèces : elle est de 25°C pour les champignons mésophiles et de 37°C pour les champignons thermophiles. Les espèces pathogènes présentent un optimum de croissance à des températures comprises entre 30 et 45°C.

1.1.1 Moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux se développant par un système de filaments ramifiés appelé thalle ou hyphes, qui produisent des spores disséminées par l'air et l'eau.

Ces micromycètes sont exosaprophytes, présents de manière ubiquitaire dans notre environnement : sol, plantes, air et eau notamment. La contamination humaine se produit principalement à partir du compartiment aérien par la voie respiratoire et l'atteinte pulmonaire est la plus fréquente. Le risque lié à la contamination *via* l'ingestion d'eau est un thème peu abordé dans la littérature et sera développé dans le chapitre 6.

Certaines moisissures peuvent produire des toxines *via* leur métabolisme secondaire, appelées « mycotoxines ». D'après le rapport de l'Afssa sur les mycotoxines (Afssa, 2009), plus de 300 métabolites secondaires de ce type, potentiellement présents sur des aliments, ont été identifiés mais seule une trentaine d'entre eux ont une toxicité préoccupante. Les principales mycotoxines susceptibles d'être retrouvées en alimentation humaine ou animale sont présentées en annexes 1 et 2.

Les moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides, en présence d'éléments nutritifs et d'humidité (activité de l'eau (a_w) supérieure à 0,6), d'où la grande variété des substrats alimentaires contaminés.

Plusieurs facteurs ont une influence sur la croissance de champignons et la production de mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz, 2000) :

- la température : les conditions de température les plus favorables à la croissance des moisissures ne correspondent pas toujours à celles de production maximale de toxines ;
- l'acidité du milieu : elle a un rôle important pour la croissance du champignon comme pour la production des toxines ;
- le taux de CO₂ : une augmentation du taux de CO₂ est efficace pour prévenir le développement des champignons et la formation de mycotoxines ;
- la présence simultanée d'autres micro-organismes, que ce soit des bactéries, des levures ou des moisissures : elle perturbe la croissance des champignons et leur production de mycotoxines.

1.1.2 Levures

Les levures sont composées d'un thalle unicellulaire qui peut s'allonger chez certaines espèces, formant alors des pseudofilaments. Ces micromycètes sont le plus souvent endo- ou épisaprophytes de la peau et des muqueuses humaines et sont l'un des constituants de la flore digestive de l'Homme, en association avec les bactéries. Quelques espèces sont également présentes dans

l'environnement : le sol, l'eau douce et l'eau de mer, mais aussi dans certains aliments, notamment les produits laitiers.

Le genre *Candida* est le plus fréquemment isolé chez l'Homme.

Les différents genres et espèces de moisissures et levures cités dans ce rapport sont répertoriés en annexe 3 et 4.

1.2 Connaissances relatives aux moisissures et levures dans les eaux (autres que eaux conditionnées)

1.2.1 Moisissures et levures présentes dans les eaux de surface et souterraines

Quelques études, aucune française, existent sur la présence de moisissures ou de levures dans les eaux de surface ou les eaux souterraines. La moitié d'entre elles a été publiée dans les années 1980 et a été réalisée sur les eaux de rivières, de lacs ou souterraines, certaines étant utilisées comme ressources pour la production d'eau destinée à la consommation humaine. Elles indiquent en général une contamination des eaux de surface plus importante que celle des eaux souterraines, avec une distribution des champignons hétérogène selon la localisation des échantillons. Certains genres de moisissures semblent plus fréquemment retrouvés, notamment *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Cladosporium*. Par ailleurs, les eaux soumises à des effets anthropiques (rejets industriels ou municipaux par exemple) semblent davantage contaminées par les levures que les sites préservés (cf. résumés des publications en annexe 5).

1.2.2 Moisissures et levures présentes dans les eaux destinées à la consommation humaine fournies par un réseau de distribution

En France, une étude publiée en 1985 évoque la présence de moisissures et levures dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) et distribuées à la population générale. Les autres études ont été menées sur différents continents.

De façon générale, une contamination régulière des eaux de distribution publique par ces champignons a été constatée, malgré la présence de chlore résiduel dans certaines d'entre elles. Les systèmes de traitement des eaux de surface existant pour la production d'EDCH ne permettent pas d'éliminer complètement les moisissures (Warris *et al.*, 2001 ; Hageskal, 2007).

Une augmentation du nombre de moisissures pendant le transport dans les réseaux a par ailleurs été constatée à plusieurs reprises, pouvant s'expliquer par une multiplication dans le réseau ou par une contamination par les biofilms.

L'EDCH distribuée dans les établissements hospitaliers, a fait l'objet de plusieurs études, l'objectif majeur étant de savoir si elle pouvait être à l'origine d'infection fongique invasive survenues chez certains patients. Ces études permettent d'avoir des données relatives à la présence de moisissures et levures dans les eaux distribuées dans les réseaux intérieurs de ce type d'établissements.

Les résultats disponibles sont très variés, tant sur les fréquences et niveaux de contamination que sur les genres et espèces identifiés. La fréquence des échantillons d'EDCH positifs en moisissures varie en effet de 3,3 % à 100% et les dénombrements observés, de moins de 1 à 100 UFC / 100 mL. Les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Phialophora* et *Cladosporium* sont les plus souvent cités. Pour les levures, selon les publications, entre 3,5 et 50 % des échantillons sont contaminés et le genre *Candida* est le plus souvent retrouvé.

Les corrélations mises en évidence entre le dénombrement des moisissures ou des levures et celui des coliformes ou de la flore bactérienne sont contradictoires, ne permettant pas d'envisager que ces bactéries soient des indicateurs de contamination fongique.

Si les données sont difficilement généralisables ou comparables, cela est dû au fait que de nombreux paramètres diffèrent d'une étude à l'autre (d'un pays à l'autre), notamment :

- les traitements de l'eau destinée à la consommation humaine,
- le climat,

- les méthodes de détection et de dénombrement utilisées pour les moisissures et les levures, en particulier les milieux, température et durée d'incubation (cf. annexe 7).

Les résumés des publications étudiées sont répertoriés en annexe 6.

1.2.3 Présence de mycotoxines dans les eaux

En France, aucune publication n'évoque la production ou la présence de mycotoxines dans les eaux. La présence d'aflatoxine B2 a été détectée à des concentrations comprises entre 0,2 et 1,7 µg/L dans un stockage d'eau à température ambiante installé sur un toit dans le sud de l'Angleterre. L'absence de trace d'aflatoxine dans la conduite d'alimentation et la présence de quelques colonies d'*Aspergillus flavus* dans le réservoir, ont conduit les auteurs à conclure à une production d'aflatoxine dans le réservoir d'eau (Paterson *et al.*, 1997).

Par ailleurs, Criado *et al.* (2005) ont détecté de la citrinine dans des bouteilles d'eau minérale inoculées avec du *Penicillium citrinum* et ayant été stockées 5 mois. Ces résultats confirment donc la possibilité qu'ont les moisissures de produire des mycotoxines dans l'eau.

Toutefois, la présence de mycotoxines dans les eaux brutes de surface ne signifie pas qu'elles ont été produites par des moisissures de l'eau. En effet, elle pourrait être due au lessivage des champs de céréales contaminés par des moisissures. En Suisse, du déoxynivalénoïl et de la zéaralénone, principales mycotoxines produites par *Fusarium*, ont été retrouvées dans des eaux de rivière pendant la période de récolte du blé. La pluviométrie joue ainsi un rôle important sur la contamination des rivières par les mycotoxines, qui peut être comparée à celle de micropolluants comme les pesticides (Bucheli *et al.*, 2008).

Certaines espèces de moisissures retrouvées dans les eaux sont susceptibles de produire des mycotoxines mais très peu de données existent sur le niveau de contamination de ces eaux et sur la stabilité des mycotoxines dans ce milieu.

1.2.4 Dégradation des caractères organoleptiques

La dégradation de la qualité organoleptique des aliments et de l'EDCH est l'un des effets indirects connus de la présence de champignons, en raison de la production de métabolites secondaires. Ainsi, *Aspergillus niger*, isolé de canalisations de distribution d'EDCH, a été à l'origine de mauvais goûts et odeurs (Ribeiro, 2006).

Par ailleurs, des problèmes de flaveur peuvent être observés dans des eaux contenant au moins 1000 UFC de moisissures filamenteuses par litre d'eau (Gonçalves *et al.*, 2006 ; Åkerstrand 1987).

2 Moisissures et levures présentes dans les eaux conditionnées

Les moisissures et levures retrouvées dans les eaux conditionnées peuvent avoir pour origine :

- l'eau à l'émergence (la ressource),
- les contenants réutilisés, contaminés par de l'eau employée pour leur nettoyage,
- l'air au contact des matériaux ou de l'eau, lors du processus de conditionnement.

2.1 Réglementation relative aux moisissures et levures dans les eaux conditionnées

Il n'existe pas de réglementation établissant une limite de qualité spécifique aux moisissures et aux levures dans les eaux conditionnées. Toutefois, l'arrêté du 14 mars 2007¹ précise les critères de qualité microbiologiques de l'eau minérale naturelle, de l'eau de source et de l'eau rendue potable par traitement conditionnées.

Cet arrêté :

- indique qu'à l'émergence et au cours de leur commercialisation, les eaux doivent être exemptes de germes témoins de contamination fécale, de parasites et de micro-organismes pathogènes ;
- fixe des limites de qualité concernant la numération des germes aérobie revivifiables (100 UFC/mL à 22°C et 20 UFC/mL à 37°C²). Il précise qu'au cours de la commercialisation, la teneur totale ne peut résulter que de l'évolution normale de sa teneur à l'émergence.

Toutefois, le dénombrement de germes aérobies revivifiables prend en compte des bactéries banales aérobies et quelques moisissures et levures mais en aucun cas leur totalité.

Selon le rapport de l'Afssa (2008) relatif aux eaux minérales naturelles, les eaux minérales naturelles et les eaux de source étant d'origine souterraine, elles ne doivent pas contenir d'éléments tels que algues et moisissures, qui traduiraient un manquement aux règles d'hygiène. Néanmoins, en France et à l'étranger, les eaux conditionnées peuvent faire l'objet de contaminations fongiques régulières.

2.2 Contamination des eaux conditionnées en France

En France, une première étude a été initiée en 2008 par le LERH de l'Afssa à Nancy, visant à déterminer conjointement à la recherche de micro-organismes indicateurs (coliformes, Entérocoques intestinaux, *Pseudomonas*, etc.), la présence de moisissures et de levures dans plus d'une cinquantaine d'eaux minérales embouteillées, commercialisées avant et après stockage d'une année à température ambiante. Les résultats de cette enquête sont attendus pour la fin de l'année 2009.

En 2000, des développements mycéliens de grande taille ont été observés dans trois bonbonnes d'eau de source de 18,9 litres non ouvertes. La DGS a sollicité l'avis de l'Afssa sur ces contaminations, le LERH ayant reçu pour analyse deux de ces bonbonnes. Les résultats ont révélé la présence d'un grand nombre de bactéries sulfito-réductrices et de champignons. Il a été constaté que ces bonbonnes présentaient des fissures au niveau du goulot mais l'origine de la contamination n'a pas été identifiée.

En 2006, des floculats de moisissures ont été retrouvés dans des eaux de sources embouteillées et commercialisées (AST Afssa, octobre 2007). L'identification des souches a mis en évidence la présence de *Geotrichum candidum* et de *Cladosporium*, non pathogènes pour l'Homme et d'origine ubiquitaire, indiquant un défaut de maîtrise des contaminations aéroportées des installations. Les niveaux de contamination n'ont toutefois pas été communiqués.

¹ Arrêté du 14 mars 2007 relatif aux critères de qualité des eaux conditionnées, aux traitements et mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique.

² À noter que la norme NF EN ISO 6222 de juillet 1999 préconise la détection et le dénombrement de la flore aérobie revivifiable présente dans l'eau après incubation des échantillons à 22°C et 36°C.

Après cet épisode, des travaux ont été entrepris sur les installations. Deux séries d'analyses ont été effectuées sur les produits finis par l'exploitant et par le laboratoire départemental agréé, l'une pendant les travaux, la période d'arrêt et la reprise de la production, la seconde en pleine exploitation, après mise en place des actions correctives et du plan de contrôle.

Les actions correctives entreprises ont conduit à des résultats satisfaisants avec une concentration moyenne en moisissures et en levures inférieure à 1 UFC / 100 mL. Des dénombrements de moisissures supérieurs au seuil de libération des lots de 5 UFC / 100 mL fixé par le producteur d'eau ont été notés dans moins de 2% des échantillons.

Par ailleurs, des valeurs faibles en moisissures et en levures ont été constatées dans les eaux de forage, lesquelles ne seraient donc pas à l'origine de la contamination des produits finis.

Les syndicats des producteurs d'eaux de source et d'eaux minérales naturelles ont été auditionnés par l'Afssa. Concernant le contrôle fongique des eaux conditionnées, certains producteurs se fixent une limite d'acceptabilité de 5 UFC/mL pour les moisissures et pour les levures, des seuils jamais atteints, même dans des bouteilles stockées depuis 2 ans, durée équivalente à la Date limite d'utilisation optimale (DLUO).

Les producteurs d'eaux peuvent effectuer quelques analyses sur la ressource plusieurs fois par an, révélant une contamination fongique faible en général.

2.3 Contamination des eaux conditionnées à l'étranger

Les publications relatives à la présence de moisissures et levures dans les eaux conditionnées à l'étranger sont assez peu nombreuses et ont toutes été menées sur de l'eau minérale.

Les résultats mentionnés dans ces études sont difficilement généralisables :

- les publications proviennent de plusieurs pays aux climats variés : Taïwan, Japon, Argentine, Brésil, Portugal,
- la réglementation relative aux modes de production et aux traitements des eaux conditionnées est différente d'un pays à l'autre : certains autorisent la désinfection de leur eau, soit par microfiltration, rayonnements ultraviolets ou ozonation ;
- les prélèvements et méthodes d'analyse diffèrent. Les volumes analysés ne sont pas toujours précisés ou ne sont pas adaptés à la détection des moisissures et des levures.

À Taïwan, Tsai et Yu (1997) ont étudié la qualité microbiologique de 136 échantillons d'eau minérale plate, dont 88 provenant d'eau produite sur place et 48 provenant d'eau importée. Les échantillons domestiques étaient plus contaminés que les échantillons importés avec 38,6% et 18,8% de contamination respectivement. Des espèces des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium* ont été isolées. La plupart des eaux minérales domestiques de Taïwan sont traitées soit par filtration (membrane de porosité 0,45 µm), soit par rayonnements ultraviolets.

Au Japon, dans une étude de 292 échantillons d'eaux minérales de 90 marques distinctes, importées ou produites au Japon, 15% des échantillons, en majorité importés, présentaient une croissance de moisissures visible à l'œil nu. La plupart de ces eaux minérales contaminées avaient été désinfectées préalablement soit par filtration, rayonnements ultraviolets, ozonation ou une combinaison de ces procédés.

Les échantillons présentant un développement de moisissures provenaient d'eau embouteillée datant de moins d'un an, certaines de moins d'un mois, mais il n'y avait pas de relation entre l'âge des bouteilles et l'ampleur de la contamination. Dans ces échantillons, plus de la moitié avaient une concentration inférieure à 10 UFC/mL et trois échantillons, une concentration supérieure à 100 UFC/mL. Toutefois, ces résultats ont été obtenus à partir de l'analyse d'1 mL d'eau seulement (cf. annexe 7). Les principaux genres détectés, *Penicillium* (37%), *Cladosporium* (13%), *Acremonium* (9%), n'étaient pas susceptibles de produire de mycotoxines.

Pour les eaux ne présentant pas de croissance visible à l'œil nu, des échantillons de 100 mL ont été analysés. Parmi eux, 9,7% étaient contaminés par des moisissures, avec pour plus de la moitié une concentration inférieure à 10 UFC / 100 mL et pour trois échantillons, une concentration supérieure à 100 UFC / 100 mL. Les genres identifiés ont été notamment *Penicillium* et *Cladosporium*, puis *Fusarium* et *Mycelia sterilia*. Des levures ont été détectées dans 5 échantillons dont un contenant plus de 100 UFC/100mL, mais elles n'ont pas été identifiées.

Aucun coliforme, entérocoque intestinal ou *Pseudomonas aeruginosa* n'a été détecté (Fujikawa et al., 1997).

Au Japon également, Oie et al. (2007) n'ont détecté aucun champignon dans les 27 eaux minérales embouteillées étudiées, 10 provenant du Japon, 12 de l'Union européenne et 5 d'Amérique du Nord. Cependant, les analyses n'ont été réalisées que sur 0,5 mL d'eau, un volume qui paraît insuffisant pour être représentatif de la flore fongique de l'eau.

Par ailleurs, les résultats ont révélé une meilleure qualité bactériologique des eaux produites au Japon probablement en raison de la réglementation japonaise qui impose de traiter les eaux soit par traitement thermique à 85°C pendant 30 minutes, soit par filtration sur une membrane de 0,45 µm. En Amérique du Nord également, certaines eaux minérales sont également traitées dans ce but, par ozonation ou rayonnements ultraviolets.

En Argentine, Cabral et Fernández Pinto (2002) ont isolé et identifié des champignons présents dans 126 échantillons d'eaux minérales embouteillées commercialisées, majoritairement *Penicillium* et *Cladosporium*. Des champignons ont été détectés dans 33% des échantillons ne contenant pas de croissance fongique visible à l'œil nu.

Seuls quelques échantillons ne présentant pas de croissance fongique visible à l'oeil nu, se sont révélés contaminés par des entérocoques intestinaux, une des bactéries indicatrices habituellement recherchées dans le cadre du contrôle sanitaire de la qualité des eaux.

Au Portugal, une enquête a été menée pendant un an dans une usine portugaise de conditionnement d'eaux en bouteilles afin de mesurer la présence de moisissures à différents niveaux de la chaîne de conditionnement : sources, réservoirs d'eau, filtres, bouteilles d'eau, bouchons, bouteilles vides, air, etc. Les auteurs ont souhaité déterminer les voies possibles de contamination en fonction des espèces identifiées. Dans le cadre de cette étude, 604 souches de moisissures ont été isolées à l'aide de techniques de culture sur milieux spécifiques.

Un effet « saison » a été observé, avec une augmentation graduelle de la fréquence des contaminations à partir du mois de mai et l'existence d'un pic début juin. *Penicillium spp* (notamment *P. brevicompactum*, *P. glabrum* et *P. chrysogenum*) et *Cladosporium spp* (*C. cladosporioides*, *C. sphaeropermium*) sont les moisissures qui ont été les plus retrouvées.

Des techniques de biologie moléculaire ont par ailleurs été utilisées pour tracer l'origine des contaminations. Elles ont révélé que ces contaminations avaient des origines multiples et que certaines souches de moisissures étaient endémiques à l'usine d'embouteillage (Ribeiro et al., 2006).

Au Brésil, Yamaguchi et al. (2007) ont observé que sur 60 échantillons d'eaux minérales de bonbonnes (20 litres), prélevés au niveau de distributeurs d'eau et analysés, 36,6% étaient contaminés par des levures et 35% par des moisissures. La concentration moyenne retrouvée en moisissures était de 11,6 UFC/mL et de 10,8 UFC/mL pour les levures : des concentrations plus importantes que celles rencontrées dans l'EDCH étudiée en parallèle (1 UFC/mL et 2,8 UFC/mL respectivement). Parmi les levures détectées dans ces échantillons figuraient *Candida parapsilosis*, *C. glabrata*, *Candida sp.* et des souches autres que *Candida*.

Une recherche et un dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale et de la flore totale ont été effectués sur ces échantillons. Les résultats ont révélé la présence de coliformes totaux dans 20% des échantillons mais une absence de coliformes fécaux.

Une corrélation positive entre les dénombrements de moisissures et ceux des bactéries hétérotrophes et des coliformes totaux a été observée de même qu'une corrélation positive entre les dénombrements de levures et ceux des bactéries hétérotrophes. En revanche, aucune relation entre les levures et les moisissures ou entre les levures et les coliformes totaux n'a été mise en évidence, suggérant l'existence de différentes sources de pollution.

2.4 Dégradation des caractères organoleptiques

En cas de détection de problèmes de flaveur dans les eaux embouteillées, des recherches de moisissures sont systématiquement menées par les producteurs d'eau.

Selon les syndicats français, ces désagréments sont généralement liés au développement de moisissures sur les étiquettes ou cartons contenant les bouteilles, lors du stockage. Les moisissures produisent des molécules comme la géosmine, le chloroanisol ou le méthylisobornéol, qui ont la capacité de passer à travers les matériaux de conditionnement et particulièrement les bouchons

fabriqués en polyéthylène. Ils confèrent alors à l'eau des goûts et odeurs désagréables. Pour prévenir au maximum ces problèmes, des précautions sont donc prises en amont, au niveau de la conception des installations : vérification de l'absence d'odeur dans les conteneurs, remplacement du matériel en bois, *etc.*

Points-clés :

Les données sur la contamination, en France, des eaux conditionnées par les moisissures et les levures, sont rares.

Plusieurs études étrangères mentionnent la présence de moisissures dans les eaux conditionnées, avec parfois des développements de moisissures visibles à l'œil nu dans les bouteilles. Les genres et espèces identifiés diffèrent, de même que les niveaux de contamination, compris entre moins de 1 et plus de 100 UFC / 100 mL ; *Penicillium* et *Cladosporium* sont les moisissures les plus fréquemment rencontrées. Les levures sont très peu étudiées. De plus, les eaux préalablement désinfectées seraient plus souvent contaminées que les eaux non traitées.

Ces résultats sont difficilement comparables ou généralisables en raison du grand nombre de paramètres variant d'une étude à l'autre.

Par ailleurs, aucune étude n'établit de lien entre la présence de moisissures et levures dans les eaux conditionnées et l'apparition d'infection fongique parmi les consommateurs.

3 Survie et croissance des moisissures et levures dans les eaux conditionnées

3.1 Survie et croissance des moisissures dans les eaux minérales ou minéralisées

3.1.1 Influence de l'espèce de moisissure et de la composition minérale de l'eau

Les cinétiques de multiplication des moisissures dans l'eau diffèrent selon les espèces. *Cladosporium cladosporioides* aurait en effet une croissance plus lente que *Alternaria alternata* et *Penicillium citrinum* (Criado *et al.*, 2005). De même, le taux de survie des moisissures dans les bouteilles diffère selon les espèces. Ainsi *Aspergillus fumigatus* se révèle plus résistante durant le stockage que *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.* et *Penicillium chrysogenum* (Pap *et al.*, 2008). En revanche, le taux d'inoculation ne semble pas avoir d'effet significatif sur la survie de ces micro-organismes.

Par ailleurs, la composition minérale de l'eau pourrait également influencer sur le développement des moisissures. Criado *et al.* (2005) ont effectivement constaté que *Penicillium citrinum* se développait uniquement dans l'eau minérale tandis qu'*Alternaria alternata* a pu être observé dans de l'eau minérale et de l'eau minéralisée artificiellement. Selon Pap *et al.* (2008) en revanche, la composition minérale de l'eau n'aurait pas d'effet sur la survie des moisissures.

3.1.2 Influence de la composition gazeuse de l'eau

L'effet de la composition gazeuse des emballages sur le développement des moisissures a été étudié principalement dans le domaine des aliments solides. En France, Pfohl-Leszkowicz (2000) a en effet mené une étude sur des substrats solides (graines, aliments) et a observé qu'une concentration faible en O₂ ou une augmentation du taux de CO₂ dans l'atmosphère était efficace pour prévenir le développement des champignons et la production de mycotoxines.

Une autre étude, réalisée en Espagne sur des produits de boulangerie, montre que l'emballage de ce type de produit sous 100% de CO₂ permet d'inhiber totalement la croissance fongique. L'importance de cet effet inhibiteur du CO₂ dépend de nombreux facteurs : pression en CO₂, concentration en O₂, température, acidité, activité de l'eau, *etc* (Guynot *et al.*, 2003).

L'addition de gaz carbonique dans les eaux gazeuses, ayant un pouvoir microbiostatique mais non microbicide, serait à même de maintenir un bas niveau de contamination bactériologique dans la bouteille.

Pap *et al.* (2008) ont réalisé une étude sur 12 eaux embouteillées, 4 eaux de source et 8 eaux minérales naturelles, provenant de 4 pays européens. Les auteurs ont constaté que la survie des moisissures dans les eaux embouteillées dépendait fortement de leur teneur en gaz. En effet, les moisissures peuvent survivre tout au long du stockage dans les eaux plates et peuvent même développer un mycélium visible à l'œil nu selon l'espèce de moisissure présente. Dans les eaux gazeuses en revanche, une diminution du nombre de moisissures a été observée au cours du stockage.

Toutefois, ces études ne permettent pas de déterminer avec certitude si l'inhibition de la croissance des moisissures est due à la présence de CO₂ ou à l'absence d'oxygène.

3.1.3 Influence du matériau de conditionnement

En Argentine, Criado *et al.* (2005) ont constaté que la croissance fongique était plus rapide après inoculation d'un champignon dans une bouteille stockée depuis 5 mois que dans une bouteille juste remplie, suggérant que les bouteilles en polyéthylène téréphtalate (PET) relarguent de la matière organique dans l'eau, utilisée par le champignon pour croître. Selon les auteurs, le di-n-butyl phtalate (DBP) est l'un des principaux plastifiants entrant dans la composition des bouteilles et confère des propriétés particulières au produit final. Une augmentation de 20% de la concentration en DBP a été constatée après un stockage des bouteilles de 5 mois par rapport aux bouteilles sortant de production.

Le DBP serait donc une source de carbone suffisante fournie par les bouteilles pour permettre aux moisissures de se développer.

Dans l'Union européenne, les phtalates n'entrent pas comme additifs dans la fabrication des bouteilles en PET et il est improbable qu'elles soient relarguées par ce matériau³. Des traces peuvent être détectées dans l'analyse d'eaux conditionnées, provenant des joints des bouchons ou d'une contamination lors de la réalisation des analyses (par les appareils d'analyse, les joints des flacons de solvants, etc.).

Pap *et al.* (2008) en revanche ont conclu dans leur étude que le matériau des bouteilles (PET ou verre) n'avait pas d'effet significatif sur la survie des moisissures. Il faut noter qu'une seule eau conditionnée dans une bouteille en verre a été analysée dans cette étude.

3.2 Survie et croissance des levures dans l'eau

Les eaux minérales pourraient constituer un milieu propice au développement des levures. En effet, certaines de ces eaux sont utilisées comme sources de minéraux pour la préparation de milieux de culture du genre *Saccharomyces*. Toutefois, la minéralisation optimale pour ce type de culture est de l'ordre de 4 g/L de milieu de culture, une valeur difficile à atteindre avec de l'eau minérale naturelle sans apport supplémentaire (Abramov *et al.*, 1999).

Par ailleurs, Odds (1991) a étudié la survie de levures conservées en laboratoire à température ambiante dans des bouteilles en verre d'eau distillée stérile. Plus de 1500 souches des levures d'origine clinique composant le soucier ont été remises en culture après une période de conservation de 1 à 18 ans. Les souches de *Candida albicans*, espèce représentant la majorité de la collection, ont présenté des taux de survie compris entre 94% et 99%.

3.3 Effet des désinfectants sur les populations de moisissures et de levures

Les traitements de désinfection semblent favoriser la survie des moisissures et des levures dans les eaux conditionnées mais ils sont interdits en Europe pour la production des eaux minérales naturelles et des eaux de source.

3.3.1 Réglementation

Au niveau européen, la directive 2009/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 juin 2009 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles (Refonte), présente les traitements autorisés. Elle précise à l'article 4 que « *tout traitement de désinfection par quelque moyen que ce soit [...] est interdit* ». Cette interdiction s'applique également aux eaux de sources mais ne concerne pas les eaux rendues potables par traitement.

L'utilisation de l'ozone comme traitement de l'eau minérale naturelle et de l'eau de source n'est autorisé que dans le but de séparer des composés du fer, du manganèse, du soufre et de l'arsenic. La limite maximale de résidu à respecter dans ces eaux est alors de 50 µg/L d'ozone dissous (Directive 2003/40/CE de la Commission du 16 mai 2003⁴).

L'air ozoné ou d'autres traitements comme les media filtrants ou les filtres à membranes, utilisés dans le but de séparer les particules solides, peuvent faire diminuer non intentionnellement la charge bactérienne de l'eau et favoriser ainsi le développement des moisissures.

Dans d'autres pays comme les États-Unis, la réglementation est différente. Les traitements de désinfection, comme la chloration, l'ozonation, la chaleur, les rayonnements ultraviolets ou la microfiltration, peuvent être utilisés séparément ou combinés lors de la production d'eaux

³ Communication de M. Feigenbaum, directeur de recherche à l'Institut national de la recherche agronomique, Unité mixte de recherche, Fractionnement des agro-ressources et emballages, Reims.

⁴ Directive 2003/40/CE de la Commission du 16 mai 2003 fixant la liste, les limites de concentration et les mentions d'étiquetage pour les constituants des eaux minérales naturelles, ainsi que les conditions d'utilisation de l'air enrichi en ozone pour le traitement des eaux minérales naturelles et des eaux de source.

conditionnées, de façon à éliminer ou détruire les micro-organismes. Parfois, le terme « stérilisation » est employé abusivement dans les pays qui utilisent ces procédés, car il ne fait pas référence à la définition de la pharmacopée mais bien à une pratique de type désinfection dont l'effet temporaire doit garantir l'absence de germe revivifiable.

3.3.2 Effets des désinfectants

3.3.2.1 Moisissures

En France, certains producteurs d'eaux conditionnées effectuent une désinfection de l'eau pour les productions à destination du marché international (hors Union européenne). En général, les rares eaux dans lesquelles la présence de levures et moisissures a été détectée font partie principalement de ces eaux traitées.

Un producteur français d'eau minérale naturelle, auditionné par l'Afssa, a mené des essais afin d'évaluer la survie de moisissures dans des bouteilles d'eau minérale naturelle sur une durée de 12 mois. Deux modalités de traitement ont été testées : l'eau minérale traitée thermiquement (10 min à 75°C) ou ozonée (0,2 mg/L). Ces eaux ont étéensemencées avec un mélange de souches sauvages d'*Acremonium*, de *Penicillium brevicompactum*, de *Cladosporium* et d'*Aspergillus fumigatus*. Des développements de moisissures ont été mis en évidence dans les eaux prétraitées uniquement, ces développements étant plus importants (parfois visibles à l'œil nu) dans les eaux traitées thermiquement que dans les eaux traitées à l'ozone.

Des études étrangères mettent également en évidence le fait que la désinfection favorise le développement des champignons. Nagy et Olson (1982) observaient déjà sur des réseaux de distribution d'eau en Californie, une présence de champignons plus importante dans les eaux chlorées que dans les eaux non chlorées.

Dans le domaine des eaux conditionnées, Fujikawa *et al.* (1997) ont constaté sur 292 échantillons d'eaux minérales importées et produites au Japon, que 59 (20%) présentaient des développements microbiologiques visibles à l'œil nu : des champignons pour 45 d'entre eux et des bactéries pour les 14 restant. Parmi les échantillons contaminés, 8 marques (18 échantillons) étaient produites au Japon et 22 marques (41 échantillons) étaient importées, principalement du Canada, mais aussi des États-Unis, d'Australie et de Nouvelle-Zélande.

La plupart des échantillons d'eau minérale contaminés avaient été désinfectés par l'une des méthodes suivante : microfiltration, rayonnements ultraviolets, ozonation ou le plus souvent par la combinaison de la filtration et de l'ozonation. Les échantillons d'eau contaminés par des champignons contenaient un nombre de bactéries beaucoup plus faible que les échantillons non contaminés.

Après ensemencement de *Penicillium sp.* et de *Cladosporium sp.* dans des eaux minérales désinfectées ou non, il a été constaté, après un stockage de plusieurs mois à 25°C, que les concentrations les plus importantes se trouvaient dans l'eau minérale préalablement désinfectée, conduisant même à la production de floculats visibles à l'œil nu. Les eaux minérales ne présentant pas de développement mycélien visible à l'œil nu étaient fortement contaminées par les bactéries contrairement aux eaux contenant des développements mycéliens visibles à l'œil nu (Fujikawa *et al.*, 1999).

Ces deux études suggèrent une compétition microbiologique entre les bactéries et les moisissures dans les eaux minérales.

3.3.2.2 Levures

Une étude réalisée par Lezcano *et al.* (2001) à Cuba portait sur l'inactivation par l'ozone d'une souche de *Candida albicans* ATCC et d'une souche sauvage en réacteur expérimental. Les résultats ont montré une diminution du délai d'inactivation avec une augmentation de la concentration en ozone dissous dans l'eau de 0,3 à 2,5 mg/L et une plus grande résistance à l'ozone de la souche sauvage. Cependant, la mise en œuvre de traitements à l'ozone semble devoir être bien maîtrisée pour inactiver les levures. En effet, Pollo *et al.* (1981) ont montré que la stimulation et l'inhibition de la croissance des levures dépendaient des doses d'ozone appliquées et du pH.

3.3.2.3 Bilan sur les désinfectants

L'application d'ozone dans le processus de conditionnement permet la destruction des bactéries. La plupart des champignons peuvent survivre à des conditions défavorables et notamment aux traitements antimicrobiens.

Les différentes études mettent en évidence un nombre plus important de champignons microscopiques dans les eaux ayant subi un traitement de désinfection par l'ozone ou le chlore que dans les eaux non traitées, suggérant des phénomènes de compétition entre les bactéries, sensibles aux oxydants et les moisissures ou levures, moins sensibles aux oxydants. Le développement des moisissures et levures, plus lent que celui des bactéries, serait favorisé par la diminution de l'occupation du milieu par ces dernières. La création de cet environnement, libéré d'une grande partie de ces bactéries compétitrices constitue donc un milieu favorable au développement des champignons.

Points-clés :

La survie et la croissance des moisissures et levures dans les eaux conditionnées dépendent de plusieurs paramètres :

- certaines espèces sont plus résistantes que d'autres et ont des cinétiques de multiplications différentes ;
- la diminution de l'oxygène et l'augmentation du CO₂ dans les bouteilles inhiberaient la croissance des moisissures ;
- certains matériaux de conditionnement, notamment les bouteilles en plastique, pourraient relarguer des sources de carbone, utilisables par les moisissures pour se développer ;
- les traitements de désinfection, qui suppriment une grande partie de la flore bactérienne dans l'eau, favorisent la croissance des moisissures et levures alors libérées de cette compétition microbiologique. Toutefois, ces traitements ne sont pas autorisés pour la production d'eau minérale naturelle et d'eau de source conditionnées dans l'Union européenne.

4 Méthodes de détection des moisissures et levures dans les eaux

Deux techniques sont employées pour détecter les moisissures et les levures dans les eaux : la culture de l'organisme sur milieu nutritif gélosé adapté et la détection du génome de l'organisme ciblé par biologie moléculaire. La composition des milieux de culture les plus utilisés est présentée en annexe 8.

La méthode par culture donne une information sur la cultivabilité et la viabilité de la souche. Les méthodes de biologie moléculaire sont beaucoup plus spécifiques que la culture sur gélose mais ne renseignent que sur la présence d'un génome, sans qu'il soit possible de conclure à la viabilité du germe.

En cas de faibles niveaux de contamination, une première étape de concentration est nécessaire.

4.1 Méthodes de détection par culture

4.1.1 Méthodes décrites dans les articles scientifiques ou utilisées dans les laboratoires d'analyse des eaux

4.1.1.1 Articles scientifiques

Les méthodes de recherche et de dénombrement des moisissures et levures, décrites dans la littérature scientifique depuis plus de 25 ans ont très peu évolué. L'analyse se résume le plus souvent à une concentration par filtration sur membrane de porosité moyenne de 0,45 µm et une incubation sur milieu nutritif avec observation visuelle des colonies. Seules deux des publications étudiées utilisent la méthode d'incorporation directe de l'échantillon (1 mL) dans une gélose.

L'identification des micro-organismes n'est pas systématique.

Toutefois, des variations importantes dans les protocoles sont observées (*cf.* annexe 7) :

- le volume analysé peut varier de 0,5 mL à 1000 mL ; il est de 100 mL dans la majorité des cas ;
- la température d'incubation varie de 20°C à 50°C ; elle est souvent de 25°C ;
- le temps d'incubation varie de 3 à 30 jours, le temps d'incubation le plus souvent constaté étant de 7 jours ;
- les milieux utilisés sont parfois supplémentés en antibiotiques, à des concentrations très variables (voir annexe 8).

Ces variations expliquent que les résultats obtenus soient très différents et difficilement généralisables ou comparables. Elles s'expliquent par le fait qu'il n'existe pas de méthodes standard pour la détection des moisissures et des levures dans les eaux.

4.1.1.2 Laboratoires agréés au titre du contrôle sanitaire des eaux et laboratoires de contrôle des producteurs d'eaux conditionnées

Dans le cadre de l'AST mentionné dans ce rapport, le LERH a réalisé une enquête auprès des laboratoires agréés pour le contrôle sanitaire des eaux concernant la recherche des champignons. À ce jour, plusieurs laboratoires du territoire métropolitain proposent des prestations de dénombrement de moisissures et de levures dans des échantillons hydriques (*cf.* tableau 2). Les méthodes utilisées reprennent la seconde partie de la méthodologie décrite dans la norme AFNOR T90-425 qui consiste à filtrer sur une membrane de porosité moyenne de 0,45 µm le volume d'eau à analyser, puis à incuber la membrane sur un milieu gélosé. Selon le laboratoire, le milieu utilisé et/ou le volume filtré pour la recherche des moisissures et des levures peuvent être différents. Certains utilisent le milieu de Sabouraud, dilué ou non, composé de peptone, de glucose et d'agar-agar, plus adapté pour la détection des moisissures qu'une simple gélose nutritive préconisée par la norme. Cependant, certains milieux ne contiennent pas d'antibiotiques, ce qui ne favorise pas le développement spécifique des champignons.

Les moisissures et les levures sont différenciées dans l'expression des résultats. En cas de présence d'une moisissure, un seul des laboratoires interrogés poursuit systématiquement l'identification jusqu'au genre.

Laboratoire agréé au titre du contrôle sanitaire des eaux	Milieux utilisés ⁵	Incubation 22°C	Différenciation morphologique des bactéries, des moisissures et des levures par examen microscopique	Identification de l'espèce
A	Sabouraud + chloramphénicol	5 à 7 jours	oui	à la demande
B	Sabouraud	5 jours	oui	à la demande
C	Sabouraud + chloramphénicol	5 jours	oui	à la demande
D	Gélose nutritive avec glucose	5 jours	oui	à la demande
E	Gélose nutritive avec glucose	5 jours	oui	à la demande
F	Gélose nutritive avec glucose	5 jours	oui	identification jusqu'au genre
G	Gélose nutritive avec glucose	5 jours	oui	à la demande

Tableau 1 : Méthodes de recherche des moisissures et des levures mises en œuvre dans des laboratoires français agréés par le ministère chargé de la santé pour la réalisation des prélèvements et des analyses du contrôle sanitaire des eaux (CSE).

Selon les syndicats des producteurs d'eau embouteillée, la surveillance de ces paramètres microbiologiques dans les eaux conditionnées commercialisées en France est effectuée en routine sur les produits finis, en particulier sur les produits à destination du Japon.

La technique généralement mise en œuvre est proche de celles employées par les laboratoires agréés au titre du contrôle sanitaire. Certains producteurs utilisent le milieu de culture YGC pour la recherche de moisissures, après filtration de 250 mL d'eau et incubation de 5 jours à 22°C. D'autres effectuent leurs analyses sur le milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol⁶, après incubation à 22°C pendant 3 à 4 jours.

4.1.2 Méthodes normalisées

Plusieurs normes relatives à la recherche des micro-organismes existent mais ne sont pas adaptées au problème spécifique des moisissures et levures dans les eaux. Ces normes, mentionnées ci-après, ne donnent donc pas de résultats fiables et représentatifs de la population fongique de l'eau.

La norme NF EN ISO 6222 de juillet 1999, intitulée « Qualité de l'eau - Dénombrement des micro-organismes revivifiants - Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé », permet de réaliser le dénombrement des micro-organismes revivifiants dont les moisissures et les levures dans des échantillons hydriques.

La méthodologie de détection préconisée consiste à incorporer l'échantillon dans une gélose nutritive et à énumérer la flore aérobie revivifiable capable de former des colonies après 44 h (\pm 4 h) à 36°C (\pm 2°C) et 68h (\pm 4 h) à 22°C (\pm 2°C).

Cette méthode de dénombrement n'est ni spécifique, ni sélective des moisissures et levures.

Dans le domaine des eaux conditionnées, la norme AFNOR T 90-425 de février 1992, intitulée « Essais des eaux - Examens bactériologiques des récipients et systèmes de bouchage destinés aux

⁵ voir composition des milieux en annexe 5

⁶ antibiotique à large spectre, à effet bactériostatique

eaux conditionnées », propose deux protocoles distincts. Le premier consiste à couler directement une gélose nutritive dans les bouteilles à tester, à les incuber à 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) pendant 5 jours, puis à dénombrer la flore totale dans ces bouteilles. Le second consiste à introduire dans la bouteille vidée de son eau, un volume d'eau stérile, à le filtrer par la suite à travers une membrane de porosité moyenne de 0,45 μm , puis à déposer la membrane sur une gélose pendant 5 jours à 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) avant lecture. Ces protocoles ne sont cependant pas spécifiques à la recherche de moisissures et de levures dans les échantillons d'eau.

La seule norme permettant de dénombrer spécifiquement les moisissures et les levures est destinée au domaine alimentaire mais n'est pas applicable à la matrice eau : il s'agit de la norme NF ISO 21527 de novembre 2008⁷. Elle comprend deux parties distinctes :

- la première partie, intitulée « Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95 », concerne des produits comme les oeufs, la viande, les produits laitiers, les fruits, *etc.* Elle décrit une technique de dénombrement des colonies sur milieu gélosé sélectif de type gélose dichloran rose Bengale chloramphénicol après incubation à 25°C $\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 5 jours.
- la seconde partie, intitulée « Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0,95 », concerne des produits comme les fruits secs, les gâteaux, la viande séchée, les céréales, *etc.* Elle décrit une technique de dénombrement des levures osmophiles et des moisissures xérophiles sur milieu gélosé sélectif de type Gélose dichloran à 18 % de glycérol, après incubation à 25°C $\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 5 à 7 jours.

Enfin, il est indiqué que ces deux techniques ne permettent pas de dénombrer des spores de moisissures et ne s'appliquent pas à l'identification de la flore fongique ou à l'examen des aliments pour la recherche de mycotoxines.

En l'absence de norme adaptée, plusieurs méthodes de détection et d'identification des moisissures et des levures dans les eaux sont utilisées.

4.2 Méthodes de biologie moléculaire

Parallèlement aux méthodes de détection par culture, de plus en plus d'outils de biologie moléculaire permettant la détection spécifique de séquences génomiques de moisissures ou de levures, sont mis en œuvre dans le cadre de travaux de recherche. Ces méthodes permettent la détection du génome de micro-organismes, dont certaines séquences de génome sont connues. Ainsi, différents auteurs ont utilisé des méthodes d'amplification géniques, pour identifier les espèces détectées par les techniques traditionnelles. Le plus souvent, la séquence ciblée correspond à la séquence génomique ribosomique 5,8 S (Hageskal *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2007, Kanzler *et al.*, 2008), 16 S (Gillings *et al.*, 2006) ou 28 S (Yamaguchi *et al.*, 2007).

Ces méthodes sont sensibles, spécifiques, relativement rapides (4h) et peuvent être semi-quantitatives. Cependant, sur une matrice minérale comme l'eau, la filtration entraîne une concentration des sels inhibiteurs de la PCR (Polymerase chain reaction)⁸, capables d'interférer au niveau des réactions enzymatiques lors de l'amplification et de générer un résultat négatif alors que l'échantillon contient le micro-organisme ciblé.

La détection du génome, contrairement à la culture, ne permet pas de déterminer la viabilité du micro-organisme isolé. Il est donc difficile d'évaluer les risques pour la santé publique.

Des méthodes moléculaires de type séquençage ou typage comme la Restriction fragment length polymorphism⁹ (RFLP) sont parfois utilisées pour l'identification des micro-organismes détectés ou pour comparer des souches d'origines différentes (provenant de l'air et de l'eau).

⁷ annule et remplace les normes ISO 7698:1990, ISO 7954:1987 et ISO 13681:1995

⁸ Amplification en chaîne par polymérisation

⁹ Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Points-clés :

Deux types de technique de détection des moisissures et des levures dans les eaux existent : les méthodes par culture et les méthodes de biologie moléculaire.

Il n'existe à ce jour aucune méthode normalisée de culture pour la détection des moisissures et levures dans les eaux. Ceci explique la diversité des protocoles utilisés, notamment les volumes d'eau filtrée, les milieux utilisés, la durée et la température d'incubation.

Les méthodes de biologie moléculaire, notamment la PCR, peuvent être également utilisées. Elles sont sensibles, spécifiques et rapides. Cependant, elles ne permettent pas de témoigner de la viabilité du micro-organisme isolé en général.

5 Origine et maîtrise des contaminations fongiques dans les entreprises de production d'eaux conditionnées

Les quelques analyses microbiologiques effectuées sur les eaux à l'émergence par les producteurs d'eau, indiquent de faibles valeurs voire une absence de moisissures et levures dans ces eaux. La contamination fongique des eaux conditionnées aurait lieu en majorité au sein même des usines de conditionnement et pourrait s'expliquer par les transferts de micro-organismes entre l'air et l'eau.

5.1 Transfert des moisissures de l'eau dans l'air et de l'air dans l'eau

5.1.1 Passage eau / air

À partir d'une eau contenant des moisissures et/ou des levures, les procédés ou processus permettant la génération d'aérosols sont susceptibles de contaminer l'air. Les gouttelettes d'eau peuvent contenir des micro-organismes et leur sédimentation, fonction de leur taille, est un facteur important de la contamination des surfaces. Des gouttes condensées de plus petite taille ("droplets nuclei" selon les anglo-saxons) peuvent être formées au cours du processus d'évaporation de l'eau de la gouttelette dans une atmosphère sèche. Ces "droplets nuclei" contenant des micro-organismes sont de taille inférieure à 10 µm et même inférieure à 5 µm en général : très légers, ils ne sont pas sensibles au phénomène de sédimentation et sont susceptibles d'être transportés facilement dans un local par les mouvements d'air.

5.1.2 Passage air / eau

Les micro-organismes de l'air peuvent contaminer une eau initialement indemne, soit par le biais des matériaux au contact de l'air, par sédimentation des poussières et des aérosols, soit par le biais de l'air lors des processus de conditionnement (rôle des "droplets nuclei"). En conséquence, le nettoyage, la désinfection des surfaces et le conditionnement en atmosphère microbiologiquement contrôlée sont fondamentaux pour garantir le maintien de la qualité d'une eau initialement indemne de contamination.

5.2 Mesures de gestion

Selon les syndicats français des producteurs d'eaux embouteillées, les installations d'embouteillage sont conçues et gérées de façon à limiter au maximum le développement des champignons. Les bouteilles sont fabriquées sur place, conformément à la réglementation. Les intrants comme les bouchons, fabriqués à l'extérieur, possèdent un cahier des charges précis : ils doivent être fabriqués en Europe sous atmosphère contrôlée et conditionnés dans des sachets en plastique. Les salles d'embouteillage et de stockage sont sous air filtré. Les bouteilles en verre consignées sont nettoyées et désinfectées avant leur utilisation.

Les producteurs réalisent par ailleurs des contrôles de routine : des recherches de levures et de moisissures sont réalisées sur les bouchons, les bouteilles et les préformes des bouteilles. Les seuils d'acceptabilité sont fixés par les producteurs eux-mêmes qui entreprennent des actions correctives en cas de dépassement : remplacement des filtres, désinfection des installations, *etc.* Des prélèvements d'air sont également régulièrement effectués dans les salles d'embouteillage.

Les articles R. 1321-23 et R. 1322-29 du Code de la santé publique, relatifs aux contrôles sanitaires et à la surveillance des eaux conditionnées, font référence aux sept principes de l'analyse des dangers et de la maîtrise des points critiques (HACCP), mentionnés dans les dispositions du règlement (CE) n°852/2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires. Selon ces articles, l'exploitant doit en effet veiller à ce que toutes les étapes de la production et de la distribution de l'eau conditionnée sous sa responsabilité soient conformes aux règles d'hygiène. L'exploitant doit en outre adapter la procédure à la suite de chaque modification du produit, du procédé ou de l'une des étapes de la production.

Cependant, aucun guide validé de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH) et d'application des principes HACCP pour les eaux conditionnées n'existe en France à ce jour, même si la réalisation de ces guides est encouragée au sein de l'Union européenne.

Aux États-Unis en revanche, l'International Bottled Water Association (IBWA), une association américaine des eaux embouteillées a publié plusieurs guides à destination des embouteilleurs d'eau nord-américains. L'un d'entre eux, intitulé « Control of Mold in Bottled Water Operations and Production » (IBWA, 2004) concerne le contrôle des moisissures lors des opérations de conditionnement de l'eau.

L'intégration des matières premières dans le plan d'embouteillage gagne de l'importance aux États-Unis alors qu'elle se fait depuis longtemps en France et dans la communauté européenne de l'embouteillage. En effet, dans ces pays, l'environnement est surveillé de façon stricte concernant les bactéries et les moisissures, en partie en raison de l'absence de désinfection dans la chaîne d'embouteillage mais également pour contrôler efficacement des contaminations à tous les points du procédé.

Selon le guide de l'IBWA (2004), certains matériaux présents dans les entreprises favoriseraient le développement des moisissures. Les installations doivent donc être munies de systèmes de contrôle de l'air afin d'éviter les contaminations par des spores provenant de l'extérieur.

De façon générale, ce guide indique que la durée du stockage doit être réduite au maximum et que tous les matériaux stockés doivent être couverts.

Points-clés :

Les eaux à l'émergence étant généralement peu contaminées, les contaminations des eaux auraient lieu principalement lors de leur conditionnement.

Les moisissures présentes dans l'air peuvent en effet contaminer l'eau *via* leur sédimentation sur les surfaces en contact ou dans l'eau directement, d'où l'importance de la filtration de l'air des salles de conditionnement.

Les installations doivent être conçues et gérées de façon à limiter au maximum le risque de contamination et à respecter les sept principes de l'HACCP mentionnés dans le Code de la santé publique.

6 Évaluation des risques associés à l'ingestion d'eau contaminée par des moisissures et des levures

L'existence d'un risque lié à l'ingestion d'eau conditionnée contaminée par des moisissures et des levures a très peu été étudiée, à l'exception d'observations faites dans le milieu hospitalier.

6.1 Identification des dangers

6.1.1 Moisissures

Il est difficile de connaître les espèces présentes dans l'eau constituant un danger pour la population. En effet, si les dangers liés à l'ingestion de mycotoxines sont documentés, peu de publications évoquent l'existence d'effets néfastes sur l'Homme liés à l'ingestion des moisissures elles-mêmes par l'eau ou les aliments.

Quelques publications évoquent le problème d'infections liées aux moisissures présentes dans l'EDCH distribuée dans les hôpitaux. Toutefois, l'une des principales voies d'exposition envisagées est l'inhalation de spores de moisissures (*Aspergillus* notamment) transmises par les aérosols formés à partir des points d'eau.

Le risque d'infection digestive ou systémique est plus fréquent chez les patients présentant un déficit immunitaire.

Des infections digestives survenues suite à la consommation de spores d'*Aspergillus* ont été décrites chez des bovins (Sarfati *et al.*, 1996) mais sont exceptionnellement rapportés chez l'Homme et uniquement chez des patients profondément immunodéprimés (Myoken *et al.*, 2001, Eggimann *et al.*, 2006).

6.1.2 Mycotoxines

Les champignons peuvent produire des métabolites secondaires comme les mycotoxines. La toxicité des mycotoxines, présentée en annexe 2, est variée. Elles peuvent en effet être hépatotoxiques, neurotoxiques ou néphrotoxique par exemple et une mycotoxine présente souvent plusieurs effets toxiques à elle seule. Leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques et leur lipophilie en font des molécules toxiques capables de persister dans l'organisme en cas d'expositions répétées et rapprochées (Afssa, 2009).

Toutefois, aucun cas d'intoxication par des mycotoxines, liée à l'ingestion régulière d'une eau (conditionnée ou non), n'est répertorié dans la littérature.

Les valeurs toxicologiques de référence des principales mycotoxines retrouvées dans les aliments, citées en annexe 1, figurent dans le rapport Afssa, intitulé « Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale » (Afssa, 2009).

6.1.3 Levures

Le risque d'infection à levures après ingestion d'eau est plus difficile à estimer et à prouver que le risque d'infection à moisissures. En effet, la majorité des levures sont des saprophytes de la peau, du tube digestif ou d'autres muqueuses humaines et les infections à levures sont des infections opportunistes d'origine essentiellement endogène. Les contaminations par ingestion quant à elles, concernent uniquement les quelques espèces présentes dans des aliments et beaucoup plus rarement dans l'environnement ou dans l'eau.

6.1.4 Molécules à l'origine de la dégradation des caractères organoleptiques

Les études ne rapportent pas d'effet sur la santé lié à l'ingestion *via* l'eau des molécules citées dans ce rapport (géosmine, octénol, chloroanisol et méthyl-isobornéol). La dégradation du goût et de l'odeur de l'eau peut toutefois être un signal d'alarme traduisant une dégradation de la qualité de l'eau, de même que l'observation à l'œil nu de filaments mycéliens.

6.2 Exposition

Quel que soit le mode de contamination (respiratoire, traumatique ou par voie digestive), les sujets à risque d'infection fongique présentent le plus souvent des pathologies lourdes.

Ce sont :

- les patients profondément immunodéprimés, à savoir les patients neutropéniques, atteints de syndromes d'immunodéficience congénitale ou acquise et/ou traités par des molécules immunosuppressives ou des corticoïdes au long cours notamment ;
- les patients de tous âges atteints de maladies pulmonaires chroniques (mucoviscidose, broncho-pneumopathie pulmonaire chronique ou broncho-pneumopathie chronique obstructive par exemple) ;
- les patients hospitalisés bénéficiant de soins lourds : réanimation, hémodialyse, chirurgie viscérale, thoracique et oncologique notamment.

Dans les hôpitaux, ces patients consomment de l'eau embouteillée mais aucune donnée nécessaire au calcul d'exposition n'est disponible.

6.3 Caractérisation des risques

6.3.1 Risques d'infection par les moisissures et les levures

Les informations relatives aux risques d'infections fongiques par ingestion d'eau conditionnée contaminée ont été réunies sur la base des éléments publiés jusqu'en 2009. À ce stade cependant, le manque de données ne permet pas d'élaborer de conclusion formelle sur le risque.

Le risque lié à l'exposition par ingestion d'eau apparaît néanmoins très faible par rapport à celui lié à une inhalation d'aérosols contaminés par des moisissures *via* l'utilisation de douches ou tout autre procédé pouvant générer des aérosols.

L'Afssa souligne toutefois le fait que les risques concernent essentiellement les populations particulièrement sensibles évoquées plus haut et très faiblement la population générale.

6.3.2 Risques d'intoxication aux mycotoxines

En l'absence de données fiables dans la littérature, relatives à la contamination des eaux par les mycotoxines, il n'est pas possible de se prononcer sur le risque associé.

Points-clés :

- ▶ Risques liés à la présence de moisissures et levures dans les eaux conditionnées

À ce jour, dans le domaine des eaux conditionnées, il n'existe pas suffisamment de données scientifiques sur les moisissures et les levures permettant d'effectuer une appréciation quantitative du risque (AQR) fiable et précise. Néanmoins, le risque peut être considéré comme très faible.

- ▶ Pertinence et faisabilité de définir des seuils pour les moisissures et levures dans les eaux conditionnées

Sur la base des données disponibles, il ne paraît pas pertinent de définir un seuil en moisissures et levures dans les eaux conditionnées vis-à-vis de la population générale et il est impossible de déterminer un seuil permettant de protéger les consommateurs les plus à risque.

7 Conclusion et recommandations

Les données et publications, en particulier françaises, relatives à la contamination des eaux par les moisissures et les levures sont rares, notamment pour les eaux conditionnées.

Les quelques données existantes, fournies pour la plupart par les syndicats français des producteurs d'eaux de sources et d'eaux minérales naturelles, ne permettent donc pas de dresser un état des lieux représentatif de la contamination des eaux conditionnées.

Si des mesures de gestion sont mises en œuvre sur les lieux de production pour limiter au maximum les contaminations fongiques, ces dernières ne sont pas considérées par les producteurs d'eaux conditionnées comme étant un problème majeur.

En l'état actuel des connaissances, le risque de contamination fongique invasive concerne essentiellement les populations particulièrement sensibles (patients immunodéprimés, atteints de maladie pulmonaire chronique, *etc.*), mais peut être considéré comme très faible pour la population générale. De plus, le risque lié à l'exposition par voie aérienne apparaît beaucoup plus important que celui lié à l'exposition par ingestion. Les doses infectantes par ingestion restent par ailleurs difficiles à évaluer car elles dépendent de nombreux facteurs comme l'espèce de champignon incriminée, la taille de l'inoculum ingéré mais également l'intégrité des systèmes digestif et immunitaire de l'hôte.

Sur la base des données disponibles, il ne paraît pas pertinent de définir un seuil en moisissures et levures dans les eaux conditionnées vis-à-vis de la population générale et il est impossible de déterminer un seuil permettant de protéger les consommateurs les plus à risque.

7.1 Acquisition de données et recommandations de recherche

Des informations complémentaires seraient nécessaires pour mieux caractériser le risque lié à la présence de moisissures et de levures dans les eaux :

- À ce jour, de nombreuses méthodes de détection et de dénombrement des moisissures et des levures présentes dans les eaux sont utilisées sans consensus. Il est donc recommandé que soit élaborée une méthode normalisée de recherche et de dénombrement spécifiques des moisissures et des levures dans les eaux, notamment les eaux conditionnées, incluant la stratégie d'échantillonnage.
- Peu de données existent sur la présence de moisissures et levures dans les eaux incluant les eaux conditionnées. Après validation de la méthode citée ci-dessus et à l'issue de la campagne d'analyse actuellement engagée par le LERH sur les eaux conditionnées, il pourrait être utile d'envisager la réalisation d'une campagne exploratoire nationale (incluant les DOM-TOM) de recherche et de dénombrement des moisissures et des levures, de la ressource utilisée jusqu'au produit délivré. Une campagne de mesure spécifique sur les boissons aromatisées à base d'eau, plus propices à la contamination par les champignons pourrait également être envisagée. Les résultats obtenus pourraient justifier une recherche ciblée de mycotoxines et la réalisation d'études sur l'écologie microbienne et les biofilms dans les usines de conditionnement d'eau ainsi que dans les réseaux de distribution et de stockage d'EDCH.
- Pourrait en outre être encouragée la réalisation d'études visant à :
 - clarifier les relations entre l'ozonation de l'eau et la présence de moisissures et levures dans les eaux conditionnées,
 - évaluer l'interaction des matériaux de conditionnement avec les moisissures et les levures y compris les effets de dégradation des matériaux par ces micro-organismes,
 - évaluer les relations entre les dénombrements de moisissures et de levures et ceux des bactéries indicatrices de contamination ou de la flore totale.

7.2 Recommandations de mesures de gestion

Il est préconisé :

- qu'un guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP soit établi et validé pour les eaux conditionnées ;
- que les producteurs d'eaux conditionnées s'assurent de la mise en place d'une procédure d'assurance qualité relative aux moisissures et levures dans leurs usines, prenant notamment en compte les risques de contamination de l'eau par aérocontamination et la qualité des intrants (bouchons).

Références bibliographiques

- Abramov, S. A., Kotenko, S. T., Khalilova, E. A. et Kisrieva, Y. S. (1999) Effects of geothermal water in the nutrient medium on morphophysiological features of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 35(3), pp. 349-352.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) (2009) Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. AFSSA, Maisons-Alfort, 308p.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) (2008) Lignes directrices pour l'évaluation des eaux minérales naturelles au regard de la sécurité alimentaire. AFSSA, Maisons-Alfort, 88p.
- Anaïssie, E. J. et Costa, S. F. (2001) Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clinical Infectious Diseases*, 33(9), pp. 1546-1548.
- Anaïssie, E. J., Kuchar, R. T., Rex, J. H., Francesconi, A., Kasai, M., Müller, F.-M. C., Lozano-Chiu, M., Summerbell, R. C., Dignani, M. C., Chanock, S. J. et Walsh, T. J. (2001) Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system : A new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), pp. 1871-1878.
- Anaïssie, E. J., Stratton, S. L., Dignani, M. C., Summerbell, R. C., Rex, J. H., Monson, T. P., Spencer, T., Kasai, M., Francesconi, A. et Walsh, T. J. (2002) Pathogenic *Aspergillus* Species recovered from a hospital water system : a 3-year prospective study. *Clinical Infectious Diseases*, 34(6), pp. 780-789.
- Arvanitidou, M., Kanellou, K., Constantinides, T. C. et Katsouyannopoulos, V. (1999) The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), pp. 81-84.
- Arvanitidou, M., Spaia, S., Velegraki, A., Pazarloglou, M., Kanetidis, D., Pangidis, P., Askepidis, N., Katsinas, G. et Katsouyannopoulos, V. (2000) High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. *Journal of Hospital Infection*, 45(3), pp. 225-230.
- Bucheli, T.D., Wettstein, F. E., Hartmann, N., Erbs, M., Vogelgsang, S., Forrer H.-R. et Schwarzenbach, R. P. (2008) *Fusarium* mycotoxins : overlooked aquatic micropollutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), pp. 1029-1034.
- Cabral, D. et Fernández Pinto, V. E. (2002) Fungal spoilage of bottled mineral water. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), pp. 73-76.
- Criado, M. V., Fernández Pinto, V. E., Badessari, A. et Cabral, D. (2005) Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), pp. 343-349.
- Eggimann, P., Chevrolet, J.-C., Starobinski, M., Majno, P., Totsch, M., Chapuis, B. et Pittet, D. (2006) Primary invasive aspergillosis of the digestive tract : report of two cases and review of the literature. *Infection*, 34(6), pp. 333-338.
- Franková, E. (1993) Isolation and identification of filamentous soil Deuteromycetes from the water environment. *Biológia, Bratislava*, 48(3), pp. 270-290.
- Franková, E. et Horecká, M. (1995) Filamentous soil fungi and unidentified bacteria in drinking water from wells and water mains near Bratislava. *Microbiological Research*, 150(3), pp. 311-313.

- Fujikawa, H., Aketagawa, J., Nakazato, M., Wauke, T., Tamura, H., Morozumi, S. et Itoh, T. (1999) Growth of moulds inoculated into commercial mineral water. *Letters in Applied Microbiology*, 28(3), pp. 211-215.
- Fujikawa, H., Wauke, T., Kusunoki, J., Noguchi, Y., Takahashi, Y., Ohta, K. et Itoh, T. (1997) Contamination of microbial foreign bodies in bottled mineral water in Tokyo, Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 82(3), pp. 287-291.
- Gillings, M. R., Holley, M. P. et Selleck, M. (2006) Molecular identification of species comprising an unusual biofilm from a groundwater treatment plant. *Biofilms*, 3(1), pp. 19-24.
- Gonçalves, A. B., Russel, R., Paterson, M. et Lima, N. (2006) Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209(3), pp. 257-264.
- Göttlich, E., Van Der Lubbe, W., Lange, B., Fiedler, S., Melchert, I., Reifenrath, M., Flemming, H.-C. et De Hoog, S. (2002) Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205(4), pp. 269-279.
- Guynot, M. E., Marín, S., Sanchis, V. et Ramos, A. J. (2003) Modified atmosphere packaging for prevention of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels. *Journal of Food Protection*, 66(10), pp. 1864-1872.
- Hageskal, G., Gaustad, P., Heier, B. T. et Skaar, I. (2007) Occurrence of moulds in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3), pp. 774-780.
- Hageskal, G., Knutsen, A. K., Gaustad, P., De Hoog, G. S. et Skaar, I. (2006) Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), pp. 7586-7593.
- Hinzelin, F. et Block, J. C. (1985) Yeasts and filamentous fungi in drinking water. *Environmental Technology Letters*, 6(3), pp. 101-106.
- IBWA (2004) Control of mold in bottled water operations and production. *International Bottled Water Association*, 33p.
- Kanzler, D., Buzina, W., Paulitsch, A., Haas, D., Platzer, E., Marth, E. et Mascher, F. (2008) Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. *Mycoses*, 51(2), pp. 165-169.
- Kauffmann-Lacroix, C., Bousseau, A., Dalle, F., Brenier-Pinchart, M.-P., Delhaes, L., Machauart, M., Gari-Toussaint M., Datry A., Lacroix C., Hennequin C., Toubas D., Morin O. (2008) Surveillance mycologique de l'eau pour la prévention des mycoses invasives dans les établissements de santé. Propositions de standardisation des méthodologies. *La Presse Médicale*, 37(5), pp. 751-759.
- Kolesnitskaya, G.N. et Maximova, E.A. (1982) The composition of yeast species in the water of the Southern Baikal Lake. *Mikrobiologia*, 51(3), pp. 501-505.
- Kwasniewska, K. (1988) Horizontal distribution and density of yeasts and filamentous fungi in Lake St. Clair water. *Journal of Great Lakes Research*, 14(4), pp. 438-443.
- Lezcano, I., Pérez Rey, R., Gutiérrez, M. S., Baluja, C. et Sánchez, E. (2001) Ozone inactivation of microorganisms in water. Gram positive bacteria and yeast. *Ozone : Science and Engineering*, 23(3), pp. 183-187.
- Myoken, Y., Sugata, T., Kyo, T.-i., Fujihara, M., Kohara, T., Katsu, M., Tamura, M. et Mikami, Y. (2001) Invasive *Aspergillus* stomatitis in patients with acute Leukemia : Report of 12 cases. *Clinical Infectious Diseases*, 33(12), pp. 1975-1980.

- Nagy, L. A. et Olson, B. H. (1982) The occurrence of filamentous fungi in drinking water distribution systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(6), pp. 667-671.
- Nucci, M., Akiti, T., Barreiros, G., Silveira, F., Revankar, S. G., Wickes, B. L., Sutton, D. A. et Patterson, T. F. (2002) Nosocomial outbreak of *Exophiala jeanselmei* fungemia associated with contamination of hospital water. *Clinical Infectious Diseases*, 34(11), pp. 1475-1480.
- Niemi, R. M., Knuth, S. et Lundström, K. (1982) Actinomycetes and fungi in surface waters and in potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2), pp. 378-388.
- Odds, F. C. (1991) Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29(6), pp. 413-415.
- Oie, S., Matsuzaka, Y., Kiyonaga, H., Maeda, K. et Kamiya A. (2008) Microbiological safety of bottled mineral water in patients susceptible to infections. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 49(4), pp 308-310.
- Pap, K., Tornai-Lehoczki J., Syposs Z. (2008) Mold challenge study in bottled natural mineral waters and spring waters. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55(2), pp. 145-155.
- Paterson, R. R. M., Kelley, J. et Gallagher, M. (1997) Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (link) in water. *Applied microbiology*, 25(6), pp. 435-436.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (2000) Écologie des moisissures et des mycotoxines : Situation en France. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 35(6), 379-388.
- Pires-Gonçalves, R. H., Sartori, F. G., Montanari, L. B., Zaia, F. E., Melhem, M. S. C., Mendes-Giannini, M. J. S. et Martins, C. H. G. (2008) Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. *Letters en Applied Microbiology*, 46, pp. 542-547.
- Pollo, I., Jaśkiewicz, Z. et Malicki, J. (1981) The effect of ozonization and pH on yeast survival in water suspension. *Nuclear and Chemical Waste Management*, 2(4), pp. 315-317.
- Ribeiro, A., Machado, A. P., Kozakiewicz, Z., Ryan, M., Luke, B., Buddie, A. G., Venâncio, A., Lima, N. et Kelley, J. (2006) Fungi in bottled water : a case study of a production plant. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(3), pp. 139-144.
- Rosenzweig, W. D., Minnigh, H. et Pipes, W. O. (1986) Fungi in potable water distribution systems. *Journal / American Water Works Association*, 78(1), pp. 53-55.
- Sarfati, J., Jensen, H. E. et Latgé, J. P. (1996) Route of infections in bovine aspergillosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 34(6), pp. 379-383.
- Tsai, G.-J. et Yu, S.-C. (1997) Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 37, pp. 137-143.
- Warris, A., Gaustad, P., Meis, J. F. G. M., Voss, A., Verweij, P. E. et Abrahamsen, T. G. (2001) Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *Journal of Hospital Infection*, 47(2), pp. 143-148.
- Warris, A. et Verweij, P. E. (2005) Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 43 (supplément 1), pp. S59-S65.
- West, P. (1986) Isolation rates and characterization of fungi in drinking water distribution systems. In *Proceedings of the American Water Works Association / Water Quality Technology Conference*, pp. 457-474.
- Yamaguchi, M. U., Rampazzo, R. D. C. P., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T. et Dias Filho, B. P. (2007) Yeasts and filamentous fungi in bottled mineral water and tap water from municipal supplies. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), pp. 1-9.

Zacheus, O. M., Lehtola, M. J., Korhonen, L. K. et Martikainen, P. J. (2001) Soft deposits, the key site for microbial growth in drinking water distribution networks. *Water Research*, 35(7), pp. 1757-1765.

Zacheus, O. M. et Martikainen, P. J. (1995) Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in cold and hot water distribution systems using water of different quality. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(12), pp. 1088-1094.

Annexe 1 : Mycotoxines et moisissures productrices associées, retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Afssa, 2009)

	Mycotoxines	Principales moisissures productrices
Mycotoxines réglementées ou en cours de réglementation	Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
	Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i>
	Patuline	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>
	Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
	Trichothécènes (groupes A et B)	<i>Fusarium langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>
	Zéaralène	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>
	Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle)	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> , <i>C. fusiformis</i>
Autres mycotoxines	Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
	Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol méthyl éther...)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i>
	Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> <i>Penicillium</i> dont <i>P. camemberti</i>
	Stérigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i>
	Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
	Stachybotryotoxines	<i>Strachybotrys chartarum</i>
	Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrème B)	<i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i>
	Phomopsines	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberrelum</i> <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigates</i>	

Annexe 2 : Effets des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés (Afssa, 2009)

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1 + M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation lipidique Bioactivation par cytochromes P450 Conjugaison aux Glutathion-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines Inhibition de la production d'ATP Détoxification par les peptidases
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse <i>in vitro</i>	Inhibition indirecte d'enzymes
Trichothécènes (groupes A et B)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
Zéaralène	Fertilité et Reproduction	Liaison aux récepteurs œstrogéniques Bioactivation par des déshydrogénases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

Annexe 3 : Genres et espèces de moisissures filamenteuses retrouvés dans les eaux

Genre	Espèce	Capacité à provoquer des problèmes organoleptiques	Présence dans la ressource		Présence au conditionnement ou traitement	Eaux conditionnées		Eaux de réseau de distribution publique
			Eau de surface	Eau souterraine		Présence	Croissance	Présence
Champignons filamenteux en général (Guynot <i>et al.</i> , 2003).								
<i>Absidia</i>	<i>sp.</i> (West, 1986)							X
<i>Acremonium</i>	<i>sp.</i> (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999) (Fujikawa <i>et al.</i> , 1997) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (West, 1986)	Production d'octénol (substance à l'origine de mauvais goûts et odeurs)				X		X
<i>Alternaria</i>	<i>sp.</i> (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Fujikawa <i>et al.</i> , 1997) (West, 1986)					X	X	X
	<i>alternata</i> (Cabral et Fernandez Pinto, 2002) (Criado <i>et al.</i> , 2005) (Fujikawa <i>et al.</i> , 1999)						X	
<i>Aspergillus</i>	<i>sp.</i> (Anaissie et Costa, 2001) (Anaissie <i>et al.</i> , 2002) (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999) (Cabral et Fernandez Pinto, 2002) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Göttlich <i>et al.</i> , 2002) (Hageskal <i>et al.</i> , 2006) (Hinzelin et Block, 1985) (Tsai et Yu, 1997) (Warris <i>et al.</i> , 2001) (West, 1986)			X	X	X		X
	<i>flavus</i> (Afssa, 2006) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Paterson <i>et al.</i> , 1997)				X			X
	<i>fumigatus</i> (Afssa, 2006) (Anaissie <i>et al.</i> , 2002) (Pap <i>et al.</i> , 2008) (Pfohl-Leszkowicz, 2000) (Warris <i>et al.</i> , 2001)				X	X	X	X
	<i>niger</i> (Guynot <i>et al.</i> , 2003) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006) (Warris <i>et al.</i> , 2001)	Mauvais goûts et odeurs dans des conduites d'EDCH		X	X			X
	<i>ochraceus</i> (Adebajo <i>et al.</i> , 1994)					X		
	<i>ustus</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)					X		
	<i>terreus</i> (Warris <i>et al.</i> , 2001)				X			X
<i>Aureobasidium</i>	<i>sp.</i> (Fujikawa <i>et al.</i> , 1997)					X		
	<i>pullulans</i> (West, 1986)							X
<i>Cephalosporium</i>	<i>sp.</i> (West, 1986)							X
<i>Cladosporium</i>	<i>sp.</i> (Fujikawa <i>et al.</i> , 1997, 1999) (Göttlich <i>et al.</i> , 2002) (Pap <i>et al.</i> , 2008) (Tsai et Yu, 1997)			X	X	X	X	X

Genre	Espèce	Capacité à provoquer des problèmes organoleptiques	Présence dans la ressource		Présence au conditionnement ou traitement	Eaux conditionnées		Eaux de réseau de distribution publique
			Eau de surface	Eau souterraine		Présence	Croissance	Présence
	(Warris <i>et al.</i> , 2001) (West, 1986)							
	ascchycete (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X			
	cladosporioides (Cabral et Fernandez Pinto, 2002) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)			X	X	X		
	herbarum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)			X	X	X		
	oxysporum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)			X	X	X		
	sphaerospermum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)			X	X	X		
	tenuissimum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)					X		
Chaetomium	sp. (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006)							X
Drechslera	sp. (West, 1986)							X
Exophiala	sp. (Göttlich <i>et al.</i> , 2002) (West, 1986)			X				X
	jeanselmei (Niccu <i>et al.</i> , 2002)	Produire d'octénol, une substance à l'origine de mauvaises goûts et odeurs.						X
Fusarium	sp. (Anaissie <i>et al.</i> , 2001) (Fujikawa <i>et al.</i> , 1997) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) Kwasniewska, 1988) (Pap <i>et al.</i> , 2008) (Pfohl-Leszkowicz, 2000)			X		X	X	X
	oxysporum (Anaissie <i>et al.</i> , 2001)							X
	roseum (Pfohl-Leszkowicz, 2000)							
	solani (Anaissie <i>et al.</i> , 2001)							X
	sporotrichioides (Anaissie <i>et al.</i> , 2001)							X
Geotrichum	sp. (West, 1986)							X
	candidum (Tsai et Yu, 1997)					X		
Moniliella	sp. (Fujikawa <i>et al.</i> , 1997)					X		
Mucor sp.	(Kwasniewska, 1988)			X				
Mycelia	sterilia (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006)							X
Paecilomyces	sp. (Kwasniewska, 1988) (Pfohl-Leszkowicz, 2000) (Warris <i>et al.</i> , 2001)			X		X		X
Penicillium	sp. (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999) (Cabral et Fernandez Pinto, 2002) (Fujikawa <i>et al.</i> , 1999) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Göttlich <i>et al.</i> , 2002) (Hageskal <i>et al.</i> , 2006) (Hinzelin et Block, 1985) (Kwasniewska, 1988) (Pfohl-Leszkowicz, 2000) (Tsai et Yu, 1997)			X	X	X	X	X

Genre	Espèce	Capacité à provoquer des problèmes organoleptiques	Présence dans la ressource		Présence au conditionnement ou traitement	Eaux conditionnées		Eaux de réseau de distribution publique
			Eau de surface	Eau souterraine		Présence	Croissance	Présence
	(Warris <i>et al.</i> , 2001) (West, 1986)							
	aurantiigriseum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X			
	brevicompactum (Foong-Cunningham <i>et al.</i> , 2006) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		X
	camemberti (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006) (Afssa, 2006)		X					
	chrysogenum (Pap <i>et al.</i> , 2008) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X	X	
	citrinum (Cabral et Fernández Pinto, 2002) (Criado <i>et al.</i> , 2005) (Fujikawa <i>et al.</i> , 1999) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X	X	
	commune (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X			
	corylophilum (Guynot <i>et al.</i> , 2003) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	crustosum (Afssa, 2006) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	decumbens (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X					
	expansum (Afssa, 2006) (Foong-Cunningham <i>et al.</i> , 2006) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Pfohl-Leszkowicz, 2000) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)	Production de géosmine (métabolite à l'origine d'odeurs)	X		X	X		X
	funiculosum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	glabrum (Cabral et Fernández Pinto, 2002) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	glandicola (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X			
	griseofulvum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X			
	crustosum (Afssa, 2006) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	decumbens (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X					
	expansum (Afssa, 2006)(Foong-Cunningham <i>et al.</i> , 2006) (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Pfohl-Leszkowicz, 2000) (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)	Production de géosmine (métabolite à l'origine d'odeurs)	X		X	X		X
	funiculosum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	glabrum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
Penicillium	glandicola (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X			
	griseofulvum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X			
	janthinellum (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X			X		

Genre	Espèce	Capacité à provoquer des problèmes organoleptiques	Présence dans la ressource		Présence au conditionnement ou traitement	Eaux conditionnées		Eaux de réseau de distribution publique
			Eau de surface	Eau souterraine		Présence	Croissance	Présence
	<i>minioluteum</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X	X		
	<i>paxilli</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	<i>pinophilum</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	<i>roqueforti</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006) (Afssa, 2006)		X		X	X		
	<i>simplicissimum</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
	<i>spinolusum</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X	X		
Penicillium	<i>thomii</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X			
	<i>variable</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)				X	X		
	<i>waksmanii</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X		X			
Phialophora	<i>sp.</i> (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006) (Göttlich <i>et al.</i> , 2002) (West, 1986)			X				X
Phoma	<i>sp.</i> (Cabral et Fernandez Pinto, 2002) (West, 1986)					X		X
Rhizopus	<i>sp.</i> (Cabral et Fernandez Pinto, 2002) (Hinzelin et Block, 1985) (Kwasniewska, 1988)		X			X		X
	<i>Stolonifer</i> (Gonçalves <i>et al.</i> , 2006)							X
Talaromyces	<i>flavus</i> (Ribeiro <i>et al.</i> , 2006)		X					
Trichoderma	<i>sp.</i> (Hageskal <i>et al.</i> , 2006) (Kwasniewska, 1988) (Warris <i>et al.</i> , 2001)		X					X
Trichophyton	<i>sp.</i> (West, 1986)							X
Ulocladium	<i>sp.</i> (West, 1986)							X

Annexe 4 : Genres et espèces de levures retrouvés dans les eaux

Genre	Espèce	Capacité à provoquer des problèmes organoleptiques	Présence dans la ressource		Présence au conditionnement ou traitement	Eaux conditionnées		Eaux de réseau de distribution publique
			Eau de surface	Eau souterraine		Présence	Croissance	Présence
Candida	spp. (Hinzelin et Block, 1985) (Odds, 1991)					X		X
	albicans (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2007)					X		
	ciferrii (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999)							X
	glabrata (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2007)					X		
	naris (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999)							X
	parapsilosis (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2007) (West, 1986)					X		X
	pseudotropicalis (West, 1986)							X
	valida (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999)							X
Cryptococcus	spp. Kolesnitskaya et maximova, 1982)		X					
	albidus (West, 1986)							X
	laurentii (West, 1986)							X
	uniguttulatus (West, 1986)							X
Klockera	spp. (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999)							X
Rhodotorula	spp. (Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999) Kolesnitskaya et maximova, 1982)		X					X
	glutinis (West, 1986)							X
	minuta (West, 1986)							X
	pilimanae (West, 1986)							X
	rubra (West, 1986)							X
	Torulasporea	rosei (West, 1986)						
Torulopsis	spp. Kolesnitskaya et maximova, 1982)		X					
	candida (West, 1986)							X

Annexe 5 : Présence de moisissures et levures dans les eaux de surface ou souterraines : résumé des publications

❖ Moisissures

Dans une étude menée sur des eaux de lacs et de rivières finlandaises utilisées comme ressource pour la production d'eau destinée à la consommation humaine (EDCH), Niemi *et al.* (1982) rapportent des dénombrements pouvant atteindre 100 moisissures par litre. Les auteurs distinguent la présence de moisissures thermophiles et mésophiles et observent une distribution inégale de ces deux types de moisissures selon la localisation des échantillons. Une concentration plus importante en moisissures thermophiles est en effet retrouvée dans les eaux de rivières par comparaison aux eaux de lacs.

Des prélèvements réalisés au mois de juin autour du lac St-Clair au Canada, ont permis d'observer une hétérogénéité de distribution des moisissures avec des densités de 1 à 300 unités formant colonies / 100 mL (UFC/100 mL). Les genres prédominants identifiés ont été *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* et *Paecilomyces* (Kwasniewska, 1988).

Plus récemment, Kanzler *et al.* (2008) ont évalué le niveau de contamination en moisissures d'eaux souterraines en Autriche et ont observé une concentration moyenne de 4925 UFC / 100 mL.

Frankova (1993) indique dans une étude menée durant trois ans en Slovaquie, que 100% des échantillons d'eaux de surface du fleuve Danube (70 échantillons) sont contaminés par des moisissures. Les genres les plus fréquemment détectés dans ces eaux sont *Fusarium* (41,4%), *Penicillium* (37,9%), *Cladosporium* (34,5%), *Trichoderma* (27,6%), *Aspergillus* (24,1%), *Acremonium*, *Alternaria* et *Paecilomyces* (17,2%).

L'étude a également été menée sur des eaux souterraines où 45% des échantillons analysés (88 échantillons) contiennent également des moisissures avec une répartition des genres différente de celle qui a été déterminée pour les eaux de surface et des taux de détection beaucoup plus fréquents, notamment *Penicillium* (82,6%), *Fusarium* (78,3%), *Trichoderma* (73,9%), *Cladosporium* (60,9%), *Aspergillus*, *Beauveria* et *Stachybotrys* (39,1%), *Paecilomyces* (34,8%), *Acremonium*, *Geotrichum* et *Trichophyton* (30,4%).

Des eaux souterraines en Rhénanie du Nord - Westphalie (Allemagne) ont également fait l'objet d'une recherche et d'une identification de moisissures par Göttlich *et al.* (2002). Les résultats indiquent que 5,1% des 511 échantillons d'eaux souterraines analysés provenant de 183 sites de prélèvement sont contaminés par des moisissures des genres *Phialophora*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Tilletiopsis*, *Verticillium* (À noter que ces résultats ont été obtenus avec des échantillons de 1mL seulement).

❖ Levures

Kolesnitskaya et Maximova (1982) ont étudié la contamination fongique à diverses profondeurs du lac Baïkal dont l'eau est considérée comme naturellement très pure et ne contenant quasiment pas de matière en suspension. Cette étude a été menée au début des années 80, c'est-à-dire avant une augmentation relative de la pollution de lac par des activités humaines.

Parmi les 224 souches de levures isolées à différentes saisons (8 genres et 22 espèces), les principaux genres retrouvés ont été *Cryptococcus*, *Torulopsis* et *Rhodotorula*, ces genres étant constamment présents tandis que *Debaryomyces*, *Sporobolomyces*, *Hansenula* et *Trichosporon* n'ont été isolés que de façon épisodique et en faible quantité. Le genre *Candida* a été encore plus rarement retrouvé. De plus, il a été constaté que les formes sporogènes prévalaient en été et en automne. Les régions soumises à des effets anthropiques contenaient quantitativement plus de levures mais avec une composition qualitative moins hétérogène que les régions préservées.

Des prélèvements réalisés au mois de juin autour du lac St-Clair au Canada Kwasniewska (1988), ont permis d'observer une hétérogénéité de distribution des levures présentes dans cette eau avec des densités comprises entre 1 et 1000 UFC / 100 mL. L'auteur présente plus particulièrement les espèces prédominantes de levures qui étaient *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* et *Aureobasidium* et rapporte une prédominance de levures à pigmentation rouge. La

quantité et les genres de levures retrouvés pourraient être dus aux nutriments présents dans l'eau du lac, liés aux rejets municipaux et industriels.

Annexe 6 : Présence de moisissures et levures dans les eaux destinées à la consommation humaine fournies par un réseau de distribution : résumé des publications

❖ Eau distribuée à la population générale

○ Moisissures

La présence de champignons micromycètes dans les réseaux publics de distribution d'EDCH est connue depuis longtemps. L'analyse d'échantillons d'eau des réseaux publics des villes de Nancy et Metz révélait, dans les années 80, la présence de moisissures dans 81% des échantillons, avec comme genres prédominants *Penicillium*, *Aspergillus* et *Rhizopus*. L'origine alors supposée était le biofilm présent dans les canalisations (Hinzelin et Block, 1985).

Nagy et Olson (1982) ont déterminé, lors d'une étude menée sur une période d'un an au Canada, une concentration moyenne en moisissures de 34 UFC / 100 mL dans des EDCH désinfectées par le chlore. Les genres retrouvés étaient *Sporocybe* et *Penicillium* (28%), *Acremonium* et *Paecilomyces* (10 à 15%) ainsi que d'autres genres tels que *Stevensomyces*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Tuberculina*, *Aspergillus*, *Cladorrhinum*, *Saccardaea*, *Phycomyces*, *Stilbum*, *Alysidium*, *Epicoccum*, *Hyaladictys*, *Leptographium*, *Phialomyces*, *Spilodochium* (<10%).

Dans le Nevada, aux États-Unis, West (1986) a analysé 978 échantillons d'eau de réseaux. Sur les 172 échantillons contaminés par des champignons (17,6%), 196 isolats fongiques ont été dénombrés dont 71% concernant des moisissures. Les genres les plus fréquemment identifiés ont été *Cladosporium* (27,1%), *Phoma* (18,6%), *Alternaria* et *Exophiala* (7,1%). Une corrélation négative a de plus été mise en évidence entre la température et le dénombrement des moisissures ainsi qu'une corrélation positive entre le dénombrement des moisissures et celui des bactéries hétérotrophes. Cette dernière relation pourrait être expliquée selon les auteurs, par une association de ces micro-organismes dans les biofilms des canalisations. Le détachement de filaments mycéliens et des bactéries associées expliquerait en effet le dénombrement important de bactéries hétérotrophes dans les échantillons d'eau contaminés par des moisissures. Les auteurs précisent que les travaux de recherche devraient être poursuivis afin de vérifier ces corrélations sur d'autres systèmes.

Frankova et Horecka (1995) ont réalisé une étude en Slovaquie, dans les environs de Bratislava sur des EDCH de puits privés non traités et de réseaux de distribution publique (eaux chlorées). Les résultats ont montré que 45% et 43% respectivement des échantillons étaient contaminés par des champignons filamenteux. Les auteurs ont également rapporté que les échantillons d'eau de puits et de réseaux étaient contaminés par les mêmes moisissures, notamment *Cladosporium*, *Penicillium* majoritairement, puis *Fusarium* et *Paecilomyces* et d'autres genres en moindre proportion, dont *Aspergillus*.

La présence de champignons filamenteux dans l'eau du réseau de distribution publique a également été mise en évidence occasionnellement en Finlande par Zacheus *et al.* (2001). Les concentrations moyennes qui ont été mesurées dans l'eau en sortie des installations de traitement et dans les réseaux de distribution étaient respectivement de 3 UFC/L et 21 UFC/L, cette augmentation pouvant être liée à une contamination, une reviviscence ou une croissance dans le réseau de distribution. Les champignons qui ont pu être identifiés appartiennent aux genres *Acremonium* et *Phialophora*. Ces deux genres, ainsi que *Penicillium* et *Cladosporium*, sont également prédominants dans les dépôts des canalisations. Le nettoyage mécanique est apparu efficace pour réduire leurs concentrations ; cette efficacité n'est que temporaire cependant car un an après un nettoyage mécanique, les concentrations de moisissures dans les dépôts étaient à nouveau égales à celles observées avant le nettoyage, à savoir entre 1.10^4 à 1.10^5 UFC/g de poids sec.

En Allemagne, des études ont également été menées dans les réseaux. Göttlich *et al.* (2002) identifient des moisissures présentes dans environ 7 à 7,5% des échantillons d'EDCH distribuées aux consommateurs. Il s'agit principalement des genres *Phialophora*, *Acremonium*, suivis des genres *Exophiala* et *Penicillium*. Aucune corrélation n'a été établie entre le dénombrement des champignons et celui des bactéries indicatrices de contamination fécale, notamment *Escherichia coli*.

Gonçalves *et al.* (2006) évoquent la surveillance de champignons mésophiles dans l'eau du robinet à Braga, au Portugal. Une moyenne de 2 à 4 colonies de champignons filamenteux a pu être mise en évidence par litre d'eau, par incubation de filtres ayant filtré 1 litre d'eau. Des pics de concentrations compris entre 10 et 20 colonies sont observés. Les deux genres les plus isolés sont *Penicillium* (40,6% des cas) particulièrement en été, et *Acremonium* (38,8%) particulièrement en hiver. Les autres champignons isolés dans les échantillons de cette eau portugaise sont *Phialophora sp.* (4,1%), *Cladosporium sp.* (3,5%), *Rhizopus stolonifer* (2,9%), du mycelium stérile¹⁰ (2,6%), *Chaetomium sp.* (0,6%), *Alternaria sp.* (0,3%) et *Aspergillus sp.* (0,3%). Des champignons filamenteux présents dans 6,2% des échantillons n'ont pas pu être identifiés. En termes de pathogènes connus pour l'Homme, *Aspergillus* a donc été isolé dans peu d'échantillons et *Fusarium sp.* n'a pas été détecté. Cependant, la température de 25°C, à laquelle ont été incubés les échantillons, était optimale pour les champignons mésophiles. Il est donc possible que la croissance d'*Aspergillus*, qui est un germe thermotolérant, ait été limitée par la température et la compétition des moisissures mésophiles. Il est donc probable qu'*Aspergillus* puisse être retrouvé en plus grande quantité dans des eaux plus chaudes.

En Norvège, des EDCH apparaissent régulièrement contaminées par des moisissures. Sur 273 échantillons réalisés par Hageskal *et al.* (2006, 2007), 169 sont contaminés (62%) à raison de 9 UFC / 100 mL en moyenne. Les fréquences de contamination des échantillons diffèrent selon la provenance des eaux : en effet, 69,7% des échantillons d'eau issus d'eaux de surface sont contaminés contre 42% pour les eaux souterraines. En revanche, la contamination moyenne est peu différente d'un type d'eau à l'autre, avec respectivement 9,5 UFC / 100 mL et 8,4 UFC / 100 mL.

Bien qu'il existe un système de traitement des eaux de surface, celui-ci ne permet pas d'éliminer complètement les moisissures dans le réseau mais permet néanmoins d'en diminuer la quantité. Le pourcentage d'échantillons positifs passe ainsi de 81% à 69% après traitement.

L'inverse semble se produire pour les eaux de nappes profondes car la quantité de moisissures augmente au cours du transport dans le réseau de distribution. Ceci serait lié aux biofilms présents dans les réseaux.

Les auteurs constatent de plus que 21 % des eaux chaudes sont contaminées avec une moyenne de 2 UFC / 100 mL, contre 70 % pour les eaux froides avec une moyenne de 7 UFC / 100 mL.

Une étude menée par Yamaguchi *et al.* (2007) à Maringá dans l'état du Paraná au Brésil, a montré que sur 60 échantillons d'eaux de réseaux de distribution publique testés, 3,3 % contenaient des champignons filamenteux. La concentration moyenne retrouvée était de 1 UFC/mL. Les auteurs n'ont pas observé l'existence d'une corrélation entre le dénombrement des moisissures et celui des coliformes totaux.

Enfin en Autriche, Kanzler *et al.* (2008) ont mis en évidence sur 34 échantillons d'EDCH une concentration moyenne en moisissures de 7,7 UFC / 100 mL. Plus de 30 genres ou espèces de moisissures ont été détectés dont notamment *Cladosporium spp.* (74,6%), des Basidiomycètes (56,4%) et *Penicillium spp.* (48,7%).

○ Levures

L'analyse d'échantillons d'eau des réseaux publics des villes de Nancy et Metz révélait, dans les années 80, la présence de levures dans 50% des échantillons, avec comme genre prédominant *Candida*. L'origine alors supposée par les auteurs était le biofilm (Hinzelin et Block, 1985).

West (1986) a analysé 978 échantillons d'eau de réseaux dans le cadre d'une étude menée dans le Nevada. Sur les 172 échantillons contaminés par des champignons, 196 isolats fongiques ont été dénombrés dont 29 % correspondant à des levures. Les espèces les plus fréquemment identifiées ont été *Candida parapsilosis* (41,1%), *Rhodotorula rubra* (19,6%) et *Cryptococcus albidus* (variant *diffluens*) (10,7%). Il a été observé par ailleurs que les levures étaient davantage susceptibles d'être isolées à de hautes températures et lorsque le dénombrement des bactéries hétérotrophes était faible. Toutefois, les auteurs précisent dans cette étude que d'autres travaux doivent être menés pour vérifier la validité de ces corrélations sur d'autres systèmes, notamment de la corrélation négative entre levures et bactéries hétérotrophes.

¹⁰ Terme utilisé pour les champignons ne produisant pas de spores, ce qui ne permet pas leur identification par les méthodes conventionnelles.

Sur les 126 échantillons d'EDCH provenant de réseaux de municipalité ou de réseaux hospitaliers analysés dans les travaux d'Arvanitidou *et al.* (1999), 11,1% des échantillons testés contiennent des levures, à raison de 4,4 UFC / 100 mL en moyenne. Les fréquences de contamination sont plus précisément de 9,5% pour les EDCH de municipalité et 11,9% pour les eaux de réseau hospitalier. Trois genres de levures ont été identifiés : *Candida* (les espèces identifiées étant *C. naris*, *C. ciferrii* et *C. valida*), *Klockera spp.* et *Rhodotorula spp.* Le genre *Candida spp.* (3,9%) est retrouvé majoritairement. Les auteurs établissent une corrélation positive entre le dénombrement des levures et celui des coliformes totaux et fécaux.

Yamaguchi *et al.* (2007) ont montré, dans une étude menée sur des eaux de réseaux à Maringá dans l'état de Paraná au Brésil, que 11,6% des 60 échantillons testés étaient contaminés par des levures, avec une concentration moyenne de 2,8 UFC/mL. Les levures détectées étaient *Candida parapsilosis* (4 échantillons), *C. glabrata* (1 échantillon), *C. albicans* (1 échantillon), *Candida sp.* (1 échantillon). Une recherche et un dénombrement des germes indicateurs et des flores ont été effectués sur ces mêmes échantillons. Les résultats sont les suivants :

- 5% contiennent des coliformes totaux ;
- aucun ne contient de coliformes fécaux ;
- aucun ne présente une flore totale dont la concentration est supérieure à 500 UFC/mL ;
- 6,67% présentent une flore totale comprise entre 50 et 500 UFC/mL ;
- 93,33% présentent une flore totale dont la concentration est inférieure à 50 UFC/mL.

Les auteurs observent par ailleurs que le dénombrement des levures est corrélé positivement avec celui des moisissures et des coliformes totaux mais également corrélé avec le dénombrement de la flore bactérienne aérobie.

Gonçalves *et al.* (2006) ont quant à eux observé une relation négative entre la présence de bactéries et celles de levures dans l'EDCH prélevée entre mars 2003 et juillet 2004 à Braga au Portugal.

❖ Eau distribuée dans les établissements de santé

La contamination de réseaux d'EDCH par des champignons filamenteux concerne également des établissements de santé, susceptibles d'héberger des populations à risque d'infections fongiques invasives. C'est pourquoi des études ont été menées afin de déterminer s'il existait une relation entre ces cas d'infections et la présence de moisissures dans l'eau.

En France, des analyses mycologiques d'eau ont été réalisées dans dix centres hospitaliers entre février 2004 et mars 2005. Elles ont été effectuées dans des services hébergeant des malades à risque, sur le premier jet d'eau de robinets, sur de l'eau froide et sur de l'eau chaude. Parmi les 203 prélèvements exploitables, 88 étaient positifs. Les résultats ont indiqué que les eaux chaudes de température supérieure à 50°C étaient moins fréquemment contaminées par les moisissures que les eaux froides, avec respectivement 4% et 52% d'échantillons contaminés et 48% pour les eaux de premier jet. Quant au niveau de contamination fongique, il a été montré qu'il était variable d'un centre à l'autre mais significativement plus faible pour les eaux chaudes supérieures à 50°C. Toutefois, 79% des eaux froides les plus colonisées présentaient une concentration en moisissures inférieure à 5 UFC/L. Les Dématiés sont les champignons qui ont été le plus fréquemment retrouvés, suivis de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* et de mycélium stérile. Les auteurs précisent par ailleurs qu'aucun cas d'infection fongique invasive nosocomiale n'a été observé dans les services étudiés au cours de cette étude (Kauffmann-Lacroix *et al.*, 2008).

Dans une étude réalisée par Arvanitidou *et al.* (1999) sur 126 échantillons d'EDCH provenant de réseaux municipaux ou de réseaux privatifs hospitaliers, des moisissures ont été détectées à une concentration moyenne de 36,6 UFC / 100 mL dans 82,5% des échantillons testés, à raison de 95,2% dans les eaux de réseaux de municipalité et 76,2% dans les eaux de réseaux hospitaliers. Parmi ces moisissures, 27 genres distincts ont été identifiés avec majoritairement des *Penicillium spp.* (50,8%) et des *Aspergillus spp.* (42,1%).

Par ailleurs, les auteurs ont observé sur l'ensemble des échantillons groupant les deux types de réseaux, une corrélation positive entre le dénombrement des moisissures et celui des bactéries hétérotrophes.

Une étude menée en Grèce par Arvanitidou *et al.* (2000), a montré que 3,5 % des échantillons de l'eau du réseau public alimentant un centre d'hémodialyse étaient contaminés par des levures. L'eau traitée spécialement pour la réalisation des dialyses et le liquide issu de la dialyse étaient plus fortement contaminés par des levures, à raison de 8,2 % et 12,9 % respectivement des échantillons analysés. Le genre *Candida* a été le plus souvent identifié.

Warris *et al.* (2001) ont évalué la présence de moisissures dans l'eau d'une unité pédiatrique de transplantation de moelle osseuse d'un hôpital d'Oslo, en Norvège. Les échantillons ont été prélevés à partir de deux robinets d'évier (eau froide) et de douches (eau chaude) situés dans l'unité ainsi qu'au niveau de la canalisation principale apportant l'eau dans l'hôpital. Les résultats suivants ont été observés :

- 99% des échantillons d'eau prélevés aux deux robinets sont contaminés, avec une concentration moyenne de 2,8 UFC / 500 mL ;
- 72% des échantillons d'eaux chaudes de douches analysés, prélevés après 15 minutes d'écoulement sont contaminés, avec une concentration moyenne de 2,5 UFC / 500 mL ;
- 100% des échantillons prélevés dans le reste du réseau de distribution de l'hôpital sont contaminés avec une concentration moyenne de 2,8 UFC / 500 mL.

Le genre le plus représenté est *Aspergillus*, l'espèce largement majoritaire étant *Aspergillus fumigatus*, retrouvée dans 49 % des échantillons d'eau prélevés aux deux robinets et dans 39 % des échantillons d'eau de la canalisation principale. Les genres *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* et *Cladosporium* sont également largement représentés dans respectivement 18 %, 26 %, 39 % et 13 % des échantillons d'eau des robinets et 11 %, 31%, 31 % et 14 % des échantillons d'eau de la canalisation principale. Cependant, il est à noter que plus de 30 % des champignons retrouvés dans ces échantillons n'ont pas pu être identifiés.

Les échantillons d'eaux chaudes des douches présentent une concentration en *Aspergillus fumigatus* nettement plus faible que les échantillons d'eau froide aux robinets. Une partie de l'eau des douches est en effet, sur ce site, chauffée à 95°C avant refroidissement par dilution et utilisation à 60°C. Toutefois, des champignons persistent encore à 60°C puisqu'ils sont encore détectés dans des échantillons d'eau prélevés au point d'utilisation.

Les auteurs ont également constaté des différences de concentration en moisissures dans les échantillons hydriques en fonction de la saison. *Aspergillus fumigatus* est en effet retrouvé dans 60 % des échantillons d'eau du robinet en hiver alors qu'il n'est retrouvé que dans 31 % des échantillons en été.

La contamination de l'eau du réseau de l'hôpital semble avoir pour origine le réseau d'eau public de la commune. En effet, tous les échantillons prélevés dans le réservoir d'eau utilisé pour la production de l'EDCH sont contaminés par des champignons filamenteux, avec une concentration moyenne de 8 UFC / 500 mL. L'eau non traitée provient de lacs forestiers. Les auteurs indiquent que le traitement mis en place consistant en une aération, une filtration à 5 µm et une chloration avec un résiduel de 0,3 à 0,5 mg/L en permet un léger abattement, réduisant la concentration en conidies à 6,1 UFC / 500 mL. L'espèce une nouvelle fois majoritairement retrouvée dans les échantillons avant et après traitement, est *Aspergillus fumigatus*.

Une étude menée par Anaissie et Costa (2001) dans un hôpital de Little Rock aux États-Unis souligne l'implication d'*Aspergillus* initialement présent dans l'eau, dans des infections touchant des patients à risque d'infections fongiques invasives. L'exposition aux champignons de ces patients serait essentiellement aérienne : les spores d'*Aspergillus* seraient transmises dans l'air par la formation d'aérosols à partir des points d'eau. Dans cette étude en effet, la concentration en *Aspergillus* aérosolisés est plus élevée dans les zones où l'usage de l'eau est important telles que les salles de soins que dans les autres (ex. couloirs) : 2,95 UFC/m³ contre 0,61 UFC/m³. De plus, le même génotype d'une souche d'*Aspergillus fumigatus* a été isolé chez un patient atteint d'une aspergillose et sur les murs de la douche de sa chambre (Anaissie *et al.*, 2002). Le système de distribution d'eau de l'hôpital serait donc la principale source de moisissures incriminée dans ces infections (Anaissie et Costa, 2001). Il a été observé par ailleurs des concentrations en *Aspergillus* plus importantes dans les réservoirs d'eau de l'hôpital que dans l'eau d'alimentation de ces réservoirs, semblant traduire une légère multiplication locale de moisissures.

Par ailleurs, des cas de fusarioses survenus dans un hôpital de Houston au Texas, ont motivé la recherche, par Anaissie *et al.* (2001), de la source de *Fusarium* incriminée, par l'analyse d'échantillons issus des patients et de l'environnement. Des espèces de *Fusarium* ont été retrouvées dans 57 % des échantillons d'eau du système de distribution de l'hôpital. Sur 92 canalisations d'évier échantillonnées,

88 % se sont révélées contaminées par *Fusarium solani*, qui a également été retrouvé dans les réservoirs d'eau du bâtiment. Par ailleurs, 16 % des 71 robinets testés et 8 % des 26 pommes de douche testées se sont révélés positifs à *Fusarium oxysporum*. Cette étude indique également que l'EDCH peut être colonisée par *Fusarium sporotrichioides*.

Les analyses menées en parallèle sur 20 patients infectés par *Fusarium solani* à l'aide de tests moléculaires, ont montré que 8 de ces patients étaient infectés soit par une souche isolée dans leur environnement hospitalier (pour 2 d'entre eux), soit par une souche isolée chez un autre de ces patients. Par conséquent, les auteurs identifient le système de distribution d'eau de l'hôpital comme une source potentielle d'espèces du genre *Fusarium*.

Dans une revue bibliographique publiée en 2005, Warris et Verweij (2005) énumèrent les voies de contamination des personnes hospitalisées à risque d'infections fongiques invasives par des pathogènes. Des moisissures sont notamment présentes dans les eaux de surfaces et les eaux de consommation, dont celles distribuées en milieu hospitalier, mais également dans des aérosols générés par les douches. *Aspergillus fumigatus*, précédemment identifié comme l'espèce de moisissure la plus représentée dans l'eau du robinet d'une unité de pédiatrie, a été isolée chez des patients infectés. Toutefois, l'existence de différences génétiques entre les souches détectées complique l'identification de l'origine de la contamination. Malgré cela, les auteurs supposent que les aérosols seraient responsables de la contamination des patients.

Annexe 7 : Synthèse des méthodes décrites dans la littérature pour la recherche des moisissures et des levures dans les eaux

Auteurs et années	Type d'échantillon	Volume analysé	Température d'incubation	Temps d'incubation	Milieu de culture	Echantillons positifs
Anaissie et Costa, 2001	Eau de réseau municipal, de réseau d'un hôpital de fontaine	1000 mL filtrés sur 0,45 µm	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Moisissures
Arvanitidou <i>et al.</i> , 1999	Eau d'alimentation	100 mL filtrés sur 0,45 µm	Température ambiante	21 à 28 jours	Sabouraud dextrose agar (SDA) + chloramphénicol	Moisissures + levures
Arvanitidou <i>et al.</i> , 2000	Eau de réseau	50 mL filtrés sur 0,45 µm	Température ambiante	21 à 28 jours	- SDA + chloramphénicol - SDA + chloramphénicol + actidione	Moisissures + levures
Cabral et Fernandez Pinto, 2002	Eaux minérales	100 mL filtrés	25°C	5 jours	Malt Extract Agar (MEA)	Moisissures
Franková, 1993, Franková et Horecká, 1995	Eau de surface et eau de nappes	1 mL	Température ambiante	30 jours	- Czapeck-Dox } +tétracycline - Sabouraud } 20mg/L - Malt agar }	Moisissures
Fujikawa <i>et al.</i> , 1997, 1999	Eaux minérales	100 mL filtrés sur 0,45 µm ou 1 mL (pour les échantillons d'eau présentant un développement visible à l'œil nu)	25°C	7 jours	Potato Dextrose Agar (PDA)	Moisissures
Gonçalves <i>et al.</i> , 2006	Eau de robinet	1000 mL filtrés sur 0,45 µm	25°C	7 jours	- Tap water agar (TWA) - Half-strength corn meal agar (CMA/2) - Neopepton-glucose agar rose Bengal aureomycin (NGRBA) - Oomycete selective medium (OSM)	Moisissures
Göttlich <i>et al.</i> , 2002	Eaux brutes + eau réseau	1 mL incorporé	20°C+/-2°C	28 jours	PDA et MEA	Moisissures
Hageskal <i>et al.</i> , 2006, 2007	Eaux brutes, eau traitée	100 mL filtrés sur 0,45 µm	20°C+/-1°C	14 jours	Dichlorane-18% glycerol agar	Moisissures
Hinzelin et Block, 1985	Eaux potables chlorées	1000 mL filtrés sur 0,45 µm	25°C	3 jours	Sabouraud + chloramphénicol	Moisissures+ levures

Auteurs et années	Type d'échantillon	Volume analysé	Température d'incubation	Temps d'incubation	Milieu de culture	Echantillons positifs
Kanzler <i>et al.</i> , 2008	Eaux profondes, eaux de puits, eaux de réseau	100 mL filtrés sur 0,45 µm	22°C	3 à 7 jours	- MEA - Sabouraud + streptomycine (40 mg/L) + chloramphénicol (100 mg/L)	Moisissures et levures
Kauffmann-Lacroix <i>et al.</i> , 2008	Eau de réseau hôpital	1000 mL	27-30°C	7 jours	Malt ou Sabouraud	Moisissures
Kwasniewska, 1988	Eaux de surface	50 et 100 mL filtrés sur 0,45 ; 0,8 et 1,2 µm	Non précisé	3 à 5 jours	Littman's oxgall Agar + streptomycine (70 mg/L) + chloramphénicol (70 mg/L)	Moisissures et levures
Nagy et Olson, 1982	Eaux potables chlorées	100 mL filtrés sur 0,45 µm	20 °C	5 jours à 7 jours	Czapeck-Dox AGAR	Moisissures
Niemi <i>et al.</i> , 1982	Eaux de surface, eaux traitées	10 à 500 mL filtrés sur 0,45 µm	Thermophile 45°C Mésophile 22°C	2 à 5 jours 7 à 14 jours	Malt Agar + Rose Bengale (35mg/L) + auréomycine (35mg/L)	Moisissures
Oie <i>et al.</i> , 2008	Eaux minérales	0,5 mL	30°C 35°C 25°C	1 à 3 jours 2 jours 2 à 7 jours	Tripticase soy Salt egg yolk agar SDA	/
Pap <i>et al.</i> , 2008	Eaux minérales et eaux de sources embouteillées	10, 50, 100, 250, 500 mL filtrés sur 0,45 µm	26°C ou 37°C	2 à 5 jours	Schauffus Pottinger m Green Yeast and Mold	Moisissures
Paterson <i>et al.</i> , 1997	Eaux de réservoir	100 mL filtrés sur 0,45 µm	25°C	14 jours	MEA + streptomycine (100 UI/mL) + chloramphénicol (0,05g/L)	Moisissures
Pires-Gonçalves <i>et al.</i> , 2008	Eaux traitées + eaux de robinets	Volume non indiqué filtré sur 0,45 µm	30°C	14 jours	SDA + 30 mg/100mL chloramphénicol	Moisissures et levures
Ribeiro <i>et al.</i> , 2006	Eaux de surface, eaux embouteillées	Non précisé	25°C	7 jours	NGRBA CMA/2 Yeast extract maltose glucose (YMG)	Moisissures
Rosenzweig <i>et al.</i> , 1986	Eaux potables	50 ml filtrés sur 0,45 µm	Non précisé	15 jours	SDA + rose Bengale (33,3 µg/mL) + streptomycine (80 µg/mL)	Moisissures
Tsai et Yu, 1997	Eaux minérales	100 mL	25°C	7 jours	Potato dextrose agar (PDA) + chloramphénicol) + (0,05mg/L) chlortetracycline (0,05mg/L)	Moisissures et levures

Auteurs et années	Type d'échantillon	Volume analysé	Température d'incubation	Temps d'incubation	Milieu de culture	Echantillons positifs
Warris <i>et al.</i> , 2001	Eaux de réseau	500 mL filtrés sur 0,45 µm	35°C	7 jours	Sabouraud glucose agar + pénicilline 20000 IE/L + streptomycine (40 mg/L)	Moisissures
West <i>et al.</i> , 1988	Eaux de réseau	50 mL	25°C (température ambiante)	7 jours	SDA	Moisissures et levures
Yamaguchi <i>et al.</i> , 2007	Eaux minérales embouteillées (distributeurs d'eau) et eaux de robinets	100 mL filtrés sur 0,45 µm	20 à 24°C	7 jours	Sabouraud + streptomycine (50 µg/mL)	Moisissures et levures
Zacheus <i>et al.</i> , 2001	Eaux de réseau	100 mL, 10 mL et 1mL filtrés sur 0,45 µm	20°C+/-2°C	7 jours	MEA	Moisissures
Zacheus et Martikainen, 1995	Eaux de réseau	1000 mL filtrés sur 0,45 µm	20°C mésophile 50°C thermophile	14 jours	MEA	Moisissures et levures

Annexe 8 : Composition des différents milieux utilisés pour la recherche des moisissures et levures

Milieu de culture	Composition
Czapek-Dox + tétracycline	Nitrate de sodium 2g/L – Chlorure de potassium 0,5g/L – Glycérophosphate de magnésium 0,5 g/L Sulfate ferreux 0,01g/L – Sulfate de potassium 0,35g/L – Saccharose 30g/L – Agar 12g/L- eau 1L – tétracycline
Czapek-Dox agar	Nitrate de sodium 2g/L – Chlorure de potassium 0,5g/L – Glycérophosphate de magnésium 0,5g/L – Sulfate ferreux 0,01g/L – Sulfate de potassium 0,35g/L – Saccharose 30g/L – Agar 12g/L- eau 1L
Dichloran-18% glycerol agar	Tryptone 5 g/L – Glucose 10 g/L - Phosphate monopotassique 1 g/L - Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O 0,5 g/L - Dichloran (dichloro-2,6-nitro-4-aniline) 2 mg/L - Chloramphénicol 0,1 g/L - Glycérol 220 g/L - Agar 13 g/L- eau 1L
Gélose à l'extrait de levure	Peptone 6 g/L – Extrait de levure 3g/L – Agar 10 à 20g – eau 1 L
Gélose à l'extrait de levure glucosé	Peptone 5 g/L – Extrait de levure 2,5g/L – Glucose 1g/L – Agar 15g – eau 1 L
Half strength corn meal agar (CMA/2)	Farine de maïs 8,5g/L – Agar 8,5g/L – eau 1L
Littman's Oxgall Agar +streptomycine + chloramphénicol	Peptones 10g/L – Dextrose 10g/L – Oxgall 15g/L – Agar 20g/L – crystal violet 0,01g/L - streptomycine 70 µg /mL - chloramphénicol 70 µg /mL) - eau 1L
Malt Agar + Rose Bengal + auréomycine	Malt extract 12,75g/L- Gelatine peptone 0,78g/L – Glycerol 2,35g/L – Dextrine 2,75g/L – Agar 15g/L – Rose Bengale 35mg/L – auréomycine 35mg/L - eau 1L
Malt extract agar (MEA)	Malt extract 12,75g/L- Gelatine peptone 0,78g/L – Glycerol 2,35g/L – Dextrine 2,75g/L – Agar 15g/L - eau 1L
Malt extract agar + streptomycine + chloramphénicol	Malt extract 12,75g/L- Gelatine peptone 0,78g/L – Glycerol 2,35g/L – Dextrine 2,75g/L – Agar 15g/L - streptomycine 100UI/mL - Chloramphénicol (0,05 g/L) - eau 1L
Neopeptone-glucose agar rose Bengal aureomycin (NGRBA)	Néopeptone 5g/L – Glucose 10g/L – auréomycine 0,67% 5ml - Rose Bengale 1% 3,5 ml – Agar 15g/L - eau 1L
Oomycete selective medium (OSM)	Farine de maïs agar 17g/L – Agar 23g/L – Saccharose 20g/L - MgSO ₄ 10 mg /L - CaCl ₂ 10 mg/L - ZnCl ₂ 1mg/L - FeSO ₄ 0,02 mg/L - CuSO ₄ 0,02 mg/L - MoO ₃ 0,02 mg/L - chlorhydrate de thiamine 2 mg/L - Benlate (bénomyl) (0,5 g Benlate dans 500 mL d'eau distillée) 25 mL – eau 975mL
Potato Dextrose Agar (PDA)	Agar 15g/L – Glucose 20g/L – extrait de pomme de terre 4g/L- eau 1L
Sabouraud + chloramphénicol	Peptones : 10g/L – glucose 40g/L – Agar 15g/L - 30 mg/100mL chloramphénicol- eau 1L
Sabouraud + penicillin + streptomycine	Peptones : 10g/L – glucose 40g/L – Agar 15g/L - pénicilline 20000IE/L - streptomycine 40 mg/L- eau 1L
Sabouraud + rose Bengal + streptomycine	Peptones : 10g/L – glucose 40g/L – Agar 15g/L - rose Bengale 33,3 µg/ml - streptomycine 80 µg/ml- eau 1L
Sabouraud + streptomycine	Peptones : 10g/L – glucose 40g/L – Agar 15g/L - streptomycine 50 ug/mL- eau 1L
Sabouraud + streptomycine + chloramphénicol	Peptones : 10g/L – glucose 40g/L – Agar 15g/L - streptomycine 40 mg/L - 100 mg chloramphénicol- eau 1L
Sabouraud dextrose agar (SDA)	Peptones : 10g/L – glucose 40g/L – Agar 15g/L- eau 1L
Tap water agar (TWA)	Agar 15g/L – eau 1L
Yeast extract glucose chloramphénicol agar (YGC)	Extrait de levure 5,0g/L - D-(+) glucose : 20,0g/L - Agar : 14,9g/L - eau 1L - Chloramphénicol : 0,1g/L
Yeast extract malt glucose agar (YMG)	Extrait de levure 3g/L - extrait de malt 3 g/L – peptone 5g/L – glucose 10g/L – agar 20g/L

