

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 26 novembre 2019

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

**relatif à une demande d'autorisation d'extension d'utilisation de l'ozone dans l'eau, en tant qu'auxiliaire technologique, pour le lavage des salades prêtes à l'emploi (dites de 4<sup>ème</sup> gamme)**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

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

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

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

*Ses avis sont publiés sur son site internet.*

---

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 25 juin 2019 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à l'autorisation d'extension d'utilisation de l'ozone sur les salades prêtes à l'emploi (dites de 4<sup>ème</sup> gamme).

### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

En application du décret du 10 mai 2011<sup>1</sup> fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine, l'Anses dispose de quatre mois à compter de la réception du dossier pour donner un avis.

La présente demande porte sur une extension d'emploi d'ozone en tant qu'auxiliaire technologique dans l'eau utilisée pour le lavage des salades dites de 4<sup>ème</sup> gamme. L'ozone est un gaz oxydant dont l'emploi en tant qu'auxiliaire technologique est actuellement autorisé en France dans deux applications pour le traitement des grains de blé avant mouture<sup>2</sup>. L'ozone peut aussi être utilisé en France pour la désinfection

---

<sup>1</sup> Décret n° 2011-509 du 10 mai 2011 fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. JO RF 12 mai 2011.

<sup>2</sup> Arrêté du 24 octobre 2018 modifiant l'arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

des eaux destinées à la consommation humaine<sup>3</sup>. Au niveau européen, l'air enrichi en ozone est autorisé pour le traitement des eaux minérales naturelles et des eaux de source<sup>4</sup>.

Le procédé appliquant l'ozone sur des produits frais est autorisé dans d'autres pays (Etats-Unis, Canada, Japon, Nouvelle Zélande, Australie). L'emploi de l'ozone a été reconnu comme GRAS (Generally Recognized as Safe) par l'US Food and Drug Administration (FDA) pour son utilisation dans le traitement des eaux minérales et comme agent désinfectant et bactéricide dans les procédés de fabrication alimentaire, dans le respect de Bonnes Pratiques de Fabrication (21CFR173.368). Par ailleurs, la littérature scientifique fait état de nombreuses recherches visant à utiliser l'ozone sur une vaste gamme de produits alimentaires (céréales, viandes, fruits de mer, amidon, chitosane, gélatine) ainsi que dans des secteurs de la laiterie, de la brasserie et des usines de traitement des déchets<sup>5</sup>.

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

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

L'expertise relève du domaine de compétences du groupe de travail « Evaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine (GT ESPA) » et du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques biologiques dans les aliments » (CES BIORISK). Les travaux ont été présentés au GT ESPA, tant sur les aspects technologiques que scientifiques, le 19 septembre 2019. Les conclusions finales du GT ESPA ont été validées le 17 octobre 2019.

Le CES BIORISK est chargé de l'évaluation des aspects relatifs à l'efficacité antimicrobienne de l'auxiliaire technologique. Les travaux d'expertise ont été discutés le 9 septembre 2019 sur la base d'un rapport initial rédigé par quatre rapporteurs et les conclusions ont été adoptées le 16 octobre 2019.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Dans ce contexte, quatre experts du CES BIORISK n'ont pas pris part aux travaux et délibérations sur cette saisine.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

---

<sup>3</sup> Circulaire n° 2000/166 du 28 mars 2000 relative aux produits de procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine.

<sup>4</sup> Directive 2003/40/CE de la Commission du 16 mai 2003. JO UE L 126/34. 22.5.2003

<sup>5</sup> Horvitz S, Cantalejo MJ. 2014. Application of ozone for the postharvest treatment of fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci* 54 :312-339 ; Lone SA, Raghunathane S, Davoodbasha MA, Srinivasana H, Leeb S-Y. 2019. An investigation on the sterilisation of berry fruit using ozone: An option to preservation and long-term storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 20: 1012 ; Pandiselvama R, Sunojb S, Manikantana MR, Kothakotac A, Hebbara KB. 2017. Application and kinetics of ozone in food preservation. *Ozone: Science & Engineering. The Journal of the International Ozone Association* 39: 115-126 ; Zhao Y-M, de Alba M, Sun D-W, Tiwari B; 2019. Principles and recent applications of novel non-thermal processing technologies for the fish industry – A review. *Crit Rev Food Sci* 59: 728-742; Brodowska AJ, Nowak A, Śmigielski K. 2017. *Crit Rev Food Sci* 58: 2176-2201; Odilichukwu C, Okpalaa R, Bonoa G, Abdulkadirb A, Madumelub CU. 2015. Ozone (O<sub>3</sub>) process technology (OPT): An exploratory brief of minimal ozone discharge applied to shrimp. *Product Energy Procedia* 75: 2427-2435.

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT ESPA ET DU CES BIORISK

#### 3.1. Concernant les aspects chimiques et technologiques

L'ozone est un gaz instable avec une durée de vie limitée. Pour cette raison, l'ozone doit être produit extemporanément sur le site d'utilisation. La rapidité de la décomposition dépend de différents paramètres (température, humidité de l'air, présence de catalyseurs hydrogène, cuivre, fer, chrome, ou du contact avec une surface solide). La solubilité de l'ozone dans l'eau (entre 0 et 30°C) est 13 fois supérieure à celle de l'oxygène et elle s'accroît lorsque la température de l'eau diminue.

La réaction globale de formation de l'ozone est de nature endothermique. L'énergie nécessaire à la production de l'ozone est généralement apportée par une décharge électrique à haute tension (type décharge couronne) dans un flux d'oxygène. La production d'ozone peut être comprise entre 5 et 50 kg ozone par heure (h) avec de l'air comme gaz vecteur à la pression de 3 à 3,5 bars et de 10 à 200 kg ozone/h avec de l'oxygène à la pression de 2 à 2,5 bars<sup>6</sup>. L'énergie requise pour générer un kg d'ozone par décharge couronne est comprise entre 6 et 8 kWh<sup>7</sup>.

Du point de vue technologique, une fois produit extemporanément, l'ozone est introduit directement dans le fond du bac de lavage par effet Venturi ou par barbotage et n'est pas stocké avant emploi. Le procédé de fabrication de salades de 4<sup>ème</sup> gamme a été bien décrit dans le dossier de demande et n'est pas détaillé dans cet avis en raison de la confidentialité des données industrielles. En résumé, le diagramme général de fabrication comporte diverses opérations unitaires (OU) depuis la réception de matières premières jusqu'à la pesée et emballage des salades lavées. L'auxiliaire technologique sera appliqué dans l'OU de lavage, avant celle de rinçage, suivie de l'OU d'essorage ou de découpe.

Les salades de 4<sup>ème</sup> gamme représentent une large gamme de produits et sont commercialisées seules ou en mélanges dans des emballages sous atmosphère protectrice. Pour les essais pilotes et reflétant au plus proche les conditions semi-industrielles décrites dans le dossier de demande, il a été décidé de tester la salade iceberg en lanières en raison des volumes importants commercialisés et de la sensibilité de la matrice aux traitements de désinfection.

##### 3.1.1. Sur les essais conduits avec le procédé

Le dossier de demande présente des résultats d'essais de lavage de salades à partir d'études en laboratoire, en phase pilote et en phase appelée semi-industrielle, au cours desquels différentes conditions de lavage ont été testées en termes de concentration d'ozone dissout, de temps de lavage et de températures. A des fins de comparaison, tous les essais incluent des essais appliquant un lavage de salades avec de l'eau chlorée. Pour rappel, l'emploi d'hypochlorite de sodium est autorisé en France depuis de nombreuses années<sup>8</sup> en tant qu'agent de décontamination dans l'eau de lavage des produits d'origine végétale : les fruits et légumes et champignons destinés à la mise en conserve et à la congélation et fruits, légumes, champignons et herbes aromatiques prêts à l'emploi (dits de 4<sup>ème</sup> gamme) à une concentration en chlore libre de 80 mg/kg (L) au maximum, avec rinçage obligatoire.

Des essais ont été réalisés afin d'évaluer les effets de la concentration en ozone dans l'eau, du temps de lavage et de la température sur la qualité finale des salades et les effets de la concentration en ozone dans l'eau et du temps de lavage sur l'efficacité antimicrobienne du lavage. A noter que compte tenu que

<sup>6</sup> <http://www.suez-environnement.fr>

<sup>7</sup> Odilichukwu C, Okpalaa R, Bonoa G, Abdulkadirb A, Madumelub CU. 2015. Ozone (O<sub>3</sub>) process technology (OPT): An exploratory brief of minimal ozone discharge applied to shrimp. Product Energy Procedia 75: 2427-2435.

<sup>8</sup> Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

l'auxiliaire technologique est un gaz, dont sa solubilité dans l'eau dépend de plusieurs facteurs, seule une concentration moyenne d'ozone dissout dans l'eau pendant le lavage peut être estimée. Par conséquent, la dose préconisée et la dose maximale mise en œuvre dans le procédé, seront définies sous la forme d'une moyenne selon les couples concentration et temps calculés (CT).

Des essais préliminaires, non présentés dans le dossier de demande, auraient montré que des CT supérieurs à 2,5 mg.min/litre(L) entraînaient des altérations visuelles (brunissement) sur certaines variétés de salades. Pour cette raison et pour des raisons économiques, seuls des CT compris entre 0,25 et 0,75 mg.min/L ont été testés dans les essais pilotes. Les CT des essais pilotes compris entre 0,25 et 0,75 mg.min/L correspondent à des concentrations moyennes en ozone dissout de 0,5 mg/L et 1,5 mg/L pendant un temps de lavage de 30 secondes à une température cible de 9°C.

Dans les essais semi-industriels, ces CT correspondaient à des concentrations moyennes de 0,125 et 0,375 mg/L (concentration cible de 0,2 mg/L) pendant un temps de lavage de 30 secondes, à une température cible de 9°C, sur une ligne industrielle traitant 200 kg des salades par heure.

### **3.1.2. Sur les résultats analytiques provenant d'essais conduits avec le procédé**

Dans la mesure où la réactivité de l'ozone dissout dans l'eau dépend des plusieurs facteurs, incluant la qualité de l'eau, trois paramètres ont été analysés pour connaître la qualité de l'eau de lavage : la concentration en carbone organique total (COT), la demande biologique en oxygène (DBO) et la demande chimique en oxygène (DCO). Après 110 min, l'eau traitée avec l'ozone présente des concentrations en COT de 30,5 ; en DBO de 4,4 et en DCO de 7,7 mg/L. Les résultats des analyses dans l'eau du bac de lavage après 25 minutes de fonctionnement sur ligne semi-industrielle traitant 200 kg de salade/heure ont été : pH 6,85 ; température de l'eau de lavage 11,2°C ; concentration d'ozone dissout en moyenne 0,23 mg/L (CT 0,46 mg.min/L). Ces valeurs ne présentent pas de différences notables par rapport aux mêmes paramètres de qualité obtenus avec de l'eau traitée par chloration.

### **3.1.3. Détermination des résidus d'ozone dans l'eau sur les salades**

L'analyse des résidus d'ozone a été faite par la méthode spectrométrique carmin indigo trisulfonate et en récupérant par centrifugation l'eau de lavage résiduelle sur des échantillons (50 g) de lanières de salades à chacune des OU suivantes : salade témoin découpée non lavée, salade lavée dans l'eau chlorée (concentration de 15 mg/L, lavage environ 2 min pour tous les essais), salade lavée dans l'eau ozonée (CT 0,6 mg.min/L), salade lavée dans l'eau ozonée (CT 0,6 mg.min/L) et rincée, salade lavée dans l'eau ozonée (CT 0,6 mg.min/L), rincée et essorée et salade lavée dans l'eau ozonée (CT 0,6 mg.min/L), rincée, essorée et emballée. La limite de quantification de cette méthode est de 128 µg d'ozone/L alors que la limite de détection (LOD) est de 4,76 µg d'ozone/L.

Les résultats des mesures en ozone résiduel dans l'eau récupérée à la surface de salades montrent tous des concentrations inférieures à la limite de détection de la méthode analytique appliquée (4,76 µg d'ozone/L).

### **3.1.4. Résultats analytiques sur les produits néoformés provenant d'essais conduits avec le procédé**

Le dossier de demande présente des résultats analytiques déterminant les niveaux en bromates ( $\text{BrO}_3^-$ ) et en bromures ( $\text{Br}^-$ ) dans l'eau du bac traitée à l'ozone. Des analyses ont aussi été conduites pour comparer le traitement à l'ozone de l'eau du bac de lavage et l'eau retenue sur les salades avec les résultats d'un traitement au chlore, connu pour induire la formation d'halogènes organiques adsorbables (AOX). Ces analyses ont été faites avec des méthodes certifiées NF.EN.ISO.10304-1, NF.EN.ISO.15061, respectivement, pour les bromures et bromates et NF.EN.ISO.9562 pour la mesure en AOX.

Les résultats de ces analyses rapportent des concentrations en bromates ou en bromures dans les eaux de lavage chlorées ou ozonées inférieures aux limites de détection des méthodes analytiques appliquées (0,2 mg/L pour les Br<sup>-</sup> et 10 µg/L pour les BrO<sup>3-</sup>). De même, les résultats analytiques sur les AOX dans les eaux de lavage traitées à l'ozone, compte tenu de la variabilité, sont tous inférieurs à la limite de détection (LOD) de la méthode analytique appliquée (0,01 mg/L). Le GT ESPA observe que la limite de qualité en bromates dans les eaux destinées à la consommation humaine est de 10 µg/L<sup>9</sup> et que de l'eau résiduelle peut rester à la surface de salades.

Le dossier de demande présente également des analyses afin d'établir si le traitement à l'ozone affecte intrinsèquement les salades. A cette fin, des marqueurs d'oxydation des composants majeurs des salades ont été mesurés dont l'acide ascorbique, l'acide déhydroascorbique et les polyphénols totaux.

Trois essais semi-industriels ont été menés testant trois conditions différentes de traitement des salades Iceberg : a) ozone dissout à 0,23 mg/L, COT 2,32 mg/L, DBO 1,43 mg/L, DCO 7 mg/L ; b) ozone dissout à 0,13 mg/L, COT 7,05 mg/L, DBO 4,31 mg/L, DCO 22,27 mg/L ; c) ozone dissout à 0,27 mg/L, COT 10,77 mg/L, DBO 6,47 mg/L, DCO 36,46 mg/L. L'évolution des concentrations de ces marqueurs a été suivie après un jour, sept jours et douze jours de traitement.

Les résultats des mesures en acide ascorbique et en acide déhydroascorbique obtenues sur la majorité de lots testés montrent que leurs taux diminuent après traitement à l'ozone à partir du septième jour de stockage. Cette diminution est restée stable après 7 jours et jusqu'à 12 jours de stockage, en comparaison aux salades témoins non traitées, mais était moins marquée que les lots de salades lavées avec de l'eau chlorée. Ces résultats étaient plus reproductibles avec les lots présentant des valeurs en COT et DCO les plus basses, alors que les lots présentant des COT et DCO les plus élevées montraient une variabilité élevée des mesures. En résumé, aucune différence dans les concentrations des marqueurs acide ascorbique et acide déhydroascorbique n'a été démontrée après traitement de l'eau de lavage avec de l'ozone ou avec du chlore.

Concernant les mesures en polyphénols totaux des salades, les résultats obtenus avec de l'eau traitée à l'ozone montrent une diminution de leur concentration après le premier jour de traitement. Toutefois, ces taux restent stables douze jours après traitement. Des résultats similaires ont été trouvés après traitement avec de l'eau traitée avec du chlore. Les valeurs en COT et DCO des lots testés n'ont pas eu d'influence sur les taux en polyphénols après traitements. En résumé, la concentration en polyphénols totaux des salades lavées ne varie pas pendant le stockage, quels que soient les traitements appliqués, ozone ou chlore.

### **3.2. Concernant les aspects toxicologiques**

Aucune valeur repère toxicologique par administration orale n'a pu être identifiée pour l'ozone dans la littérature consultée. Le dossier de demande a proposé une approche indirecte visant à comparer les niveaux de consommation de salades lavées avec de l'eau ozonée à la consommation d'autres produits fabriqués à partir des matières premières végétales traitées avec l'ozone. Le raisonnement étant que, compte tenu du pouvoir oxydant de l'ozone sur toutes les matières premières, une éventuelle dangerosité des produits traités pourrait être identifiée à partir d'autres denrées, qui plus est à partir de celles représentant des produits de grande consommation.

---

<sup>9</sup> Afssa. Fiche 20 : Evaluation des risques sanitaires liés au dépassement des limites de qualité des bromates dans les eaux destinées à la consommation humaine. Limite de qualité (à partir du 25 décembre 2008) : 10 µg/L. Saisine 2004-SA-0063.

Comme précisé auparavant, l'emploi d'ozone en tant qu'auxiliaire technologique est autorisé en France pour le traitement des grains de blé avant mouture. L'étude de Gaou *et al.* en 2006<sup>10</sup> n'a pas rapporté d'effets adverses chez des rats nourris pendant 4 semaines avec des grains de blé traité avec l'ozone. Les produits issus du traitement de cette matière première sont les produits de pain et panification sèche et les pâtisseries et gâteaux<sup>11</sup>. La consommation de pains et produits de panification sèche est estimée en France, pour les plus forts consommateurs adultes à 266 g/jour et à environ 150 g/jour pour les plus forts consommateurs enfants. La consommation des pâtisseries et gâteaux est estimée en France, respectivement, à environ 365 g/jour et 109 g/jour.

En comparaison, la consommation de salades en France est estimée à environ 64 g/jour chez les adultes pour les plus forts consommateurs (INCA 3)<sup>12</sup>. Ces estimations sont conservatrices car elles incluent la consommation des toutes salades confondues, celles de 4<sup>ème</sup> gamme vendues emballées mais aussi la consommation des salades entières non-emballées. La consommation de salades lavées avec de l'eau contenant de l'ozone est donc inférieure à celle d'autres produits fabriqués avec des matières premières traitées à l'ozone.

La totalité des données analysées dans cet avis permet ainsi d'estimer que la consommation de salades lavées avec de l'eau ozonée ne présente pas plus de risque sanitaire que la consommation des salades lavées avec de l'eau chlorée.

### **3.3. Concernant les aspects microbiologiques**

L'activité antimicrobienne de l'ozone est en relation avec son pouvoir oxydant, étant le second agent oxydant le plus puissant après le fluor. L'objectif de l'utilisation de l'ozone sur la charge microbienne des salades et/ou sur la maîtrise de la charge microbienne des eaux de lavage au cours du temps n'est pas explicitement mentionné dans le dossier du pétitionnaire, mais son utilisation est envisagée comme alternative à l'eau chlorée dans l'eau de lavage des salades de 4<sup>ème</sup> gamme.

Les données d'efficacité antimicrobienne de l'ozone rapportées par le pétitionnaire sont issues de la littérature, ainsi que d'essais qui ont été réalisés sur pilote puis sur ligne semi-industrielle. L'efficacité des traitements (ozone ou chlore) est évaluée en utilisant le CT comme unité de traitement, qui peut être difficile à définir compte-tenu de la réactivité de l'ozone, mais est néanmoins utilisé par la communauté scientifique pour uniformiser les évaluations de l'ozone sur les microorganismes. Le plus souvent, les essais microbiologiques sont réalisés en triplicat technique sans analyse statistique et les résultats sont présentés sous forme de graphique. Les données sur échantillons témoins (traités à l'eau potable) ne sont pas toujours disponibles, la nomenclature des échantillons pas toujours clairement explicitée.

Les analyses microbiologiques portent essentiellement sur la salade Iceberg coupée en lanières. Des essais sur les virus ont également été réalisés sur la salade mâche.

Les bactéries retenues pour les essais pilotes sont celles faisant l'objet de critères microbiologiques dans le Règlement (CE) n°2073/2005, *E. coli* comme critère d'hygiène des procédés, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* comme critères de sécurité. Le choix des parasites protozoaires et des virus

<sup>10</sup> Gaou I, Dubois M, Leszkowicz-Pfohl A, Coste C, de Jouffrey S, Parent-Massin D. 2006. Safety of Oxygreen. Part 1. A four-week toxicity study in rat by dietary administration of treated wheats. Food Addit Contam 22: 1113-1119.

<sup>11</sup> Avis Anses relatif à l'autorisation d'emploi de l'ozone en tant qu'auxiliaire technologique pour le traitement du blé avant mouture, destiné à la fabrication des farines entrant dans la composition des produits de pâtisserie contenant des sucres simples ajoutés à hauteur de 7 à 50 % du poids sec. 24 juillet 2003. Saisine 2003-SA-0055.

<sup>12</sup> Etude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA3). ANSES. Juin 2017. <https://www.anses.fr/fr/content/inca-3-evolution-des-habitudes-et-modes-de-consommation-de-nouveaux-enjeux-en-mati%C3%A8re-de>

entériques est pertinent au regard des données épidémiologiques<sup>13</sup>. Pour les essais semi-industriels, les microorganismes aérobies mésophiles, les entérobactéries et les levures-moisissures ont été analysées sur les salades traitées avec de l'ozone ou chlore.

### 3.3.1. Examen des données bibliographiques

L'étude bibliographique présentée par le pétitionnaire (> 50 références) décrit l'efficacité de l'ozone sur des bactéries à Gram positif et négatif, des champignons (levures, et spores de moisissures), des parasites protozoaires (kystes de *Giardia* et oocystes de *Cryptosporidium*), et des virus (norovirus murin, virus de l'hépatite A principalement), en suspension ou adhérents sur des végétaux. D'après cette étude de la littérature, l'ozone est efficace sur les bactéries et les virus entériques en suspension dans l'eau, mais son efficacité sur les végétaux est bien moindre et plus variable. L'ozone est peu efficace sur les spores de moisissures et peu efficace sur les parasites à des concentrations utilisables en pratique.

### 3.3.2. Examen des données des pré-essais et essais pilotes

Des pré-essais ont été conduits avec un objectif de déterminer le CT maximal permettant une efficacité antimicrobienne intéressante tout en étant acceptable d'un point de vue sensoriel. Les dénombrements de microorganismes aérobies mésophiles des feuilles de salades, traitées avec de l'ozone (CT compris entre 0,11 et 2,32 mg.min/L) ou avec de l'eau chlorée (CT 15 mg.min/L), ont été suivis pendant 13 jours. Les résultats des pré-essais sont présentés sous forme de graphique et semblent montrer une évolution similaire des microorganismes aérobies mésophiles (+ 3 log) quel que soit l'auxiliaire technologique testé. Il est impossible de conclure sur l'efficacité bactéricide des traitements car il manque l'analyse d'une salade non traitée ou traitée à l'eau potable (à T=0) qui aurait servi de témoin. Le nombre d'échantillon n'est pas précisé et il n'y a pas d'analyse statistique.

Pour des raisons économiques, le pétitionnaire a choisi de retenir des CT inférieurs ou égaux à 0,75 mg.min/L pour les essais ultérieurs. Des essais pilotes ont ensuite été conduits après inoculation des salades avec différents microorganismes (bactéries, virus ou parasites).

- Concernant les parasites (récupération des oocystes de *Cryptosporidium*) les analyses semblent montrer qu'il n'y a pas de différence entre le traitement à l'eau ozonée (CT 0,75 mg.min/L), à l'eau chlorée (CT 30 mg.min/L) ou à l'eau potable. Quatre réplicats ont été effectués lors de ces différentes analyses, les écart-types obtenus sont relativement faibles mais aucune analyse statistique n'est présentée.
- Concernant les salades artificiellement contaminées par les bactéries (*E. coli*, *Salmonella* et *L. monocytogenes*), deux lavages à l'ozone (CT 0,25 et 0,75 mg.min/L) ont été comparés à un lavage à l'eau chlorée (CT 30 mg.min/L), mais pas à un lavage à l'eau potable. Les résultats de ces essais semblent montrer qu'un lavage à l'eau ozonée entraîne des réductions de dénombrements similaires à celles obtenues après un lavage à l'eau chlorée, diminutions qui n'excèdent pas 1 log. Le petit nombre d'essais<sup>14</sup>, de surcroît en l'absence d'analyse statistique, ne permet pas d'émettre une conclusion définitive.
- Concernant les virus entériques, l'effet virucide des différentes étapes (prélavage, lavage, rinçage, essorage) de la production des salades de 4<sup>ème</sup> gamme a été évalué en utilisant un virus modèle de virus entériques pathogènes (norovirus humain et VHA), le bactériophage MS2. Un abattement

<sup>13</sup> Avis et Rapport de l'Anses relatifs à l'attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire. Partie 2 : Analyse des données épidémiologiques, 16 novembre 2018. Saisine n°2015-SA-0162.

<sup>14</sup> D'après le Règlement (CE) n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires le nombre d'échantillons à analyser est de 5.

d'environ 0,7 log pour la mâche et 0,5 log pour la laitue est observé pour les lavages avec un auxiliaire technologique, l'ozone (CT 0,46 mg.min/L) ou le chlore (CT 32 mg.min/L) en comparaison du lavage à l'eau potable. Par ailleurs, l'inoculation des phages dans l'eau de lavage pendant 30 min semblent montrer un abattement d'environ 3 log (ozone ou chlorée), ce qui montre une activité virucide intéressante quand les virus sont en suspension dans l'eau. Le nombre d'essais (2 à 3 essais par condition) ne permet cependant pas d'émettre une conclusion définitive.

### **3.3.3. Examen des données des essais semi-industriels**

Trois essais sur une ligne semi-industrielle ont été menés en comparant les lavages à l'eau ozonée et à l'eau chlorée dans des eaux de différentes qualités (COT/DBO/DCO différentes). La concentration d'ozone dissout, les durées des essais et les périodes de prélèvements diffèrent entre les essais. Seul le lot C est caractérisé par 3 périodes de prélèvement, chacune associée à un CT différent du fait de la fluctuation des concentrations en ozone dissous au cours du temps (CT compris entre  $0,22 \pm 0,2$  et  $0,66 \pm 0,06$  mg.min/L au moment des prélèvements). Les résultats sont présentés sous forme de graphique.

- La qualité microbiologique des eaux de lavage a été suivie par l'analyse des microorganismes aérobies mésophiles dans 1 ml d'eau. Lors des trois essais, les eaux de lavage à l'eau chlorée ou à l'eau ozonée ont présenté des microorganismes aérobies mésophiles compris entre « Absence dans 1 ml » à « inférieur à 100 UFC/ml », seuil de « bonne qualité microbiologique » fixé par le pétitionnaire<sup>15</sup>.
- La qualité microbiologique des salades a été suivie au cours du temps par un dénombrement des microorganismes aérobies mésophiles, des entérobactéries et des levures-moisissures (UFC/g) sur 25 g de salade après 24 h et 12 jours de stockage au froid positif (4°C pendant 4 jours puis 8°C), associé à une recherche de *L. monocytogenes* et de *Salmonella* après 7 jours à 4°C également sur 25 g de salade. Il est à noter qu'il n'y a pas eu d'analyse d'*E. coli*.

À 24 h, la qualité microbiologique des salades traitées avec les deux auxiliaires est comparée à celle d'une salade témoin non traitée. Il n'est pas clairement indiqué si ce témoin correspond à une salade lavée à l'eau potable ou à une salade non lavée. L'analyse globale sur l'ensemble des données microbiologiques des salades pour les trois lots tend à montrer que les lavages à l'eau ozonée ou chlorée n'engendrent pas de réduction des microorganismes aérobies mésophiles par rapport aux salades non traitées, alors que les deux traitements réduisent les entérobactéries et les levures de  $\pm 1$  log UFC/g. Les analyses du lot C tendent à montrer une augmentation des microorganismes aérobies mésophiles et des entérobactéries des salades traitées par l'ozone au cours du lavage (prélèvement après 25, 85 et 130 min) sans dépasser la contamination microbienne de la salade témoin non traitée.

Après 12 jours de vieillissement accéléré (conservées pendant 4 jours à 4°C puis pendant 8 jours à 8°C), les analyses des trois catégories de microorganismes paraissent montrer des compositions microbiologiques similaires des salades pour les deux lavages, à l'eau ozonée ou chlorée, quel que soit le moment de prélèvement au cours du lavage. En l'absence de données sur les salades non traitées avec l'auxiliaire ayant subi le même procédé de lavage, il n'est pas possible de conclure sur l'efficacité antimicrobienne de ces traitements. Une absence de *Salmonella* et de *Listeria monocytogenes* dans 25 g de salade est par ailleurs enregistrée dans tous les cas, sur un nombre d'échantillon non-communicué.

Comme dans la partie des essais pilotes, l'absence de certains témoins, le petit nombre d'essais et l'absence d'analyse statistique ne permettent pas d'émettre des conclusions définitives.

---

<sup>15</sup> Dans la note d'information de la Commission Européenne concernant la gestion des risques microbiologiques des fruits et légumes frais au stade de la production primaire (2017/C163/01), il est spécifié que les eaux utilisées pour le premier lavage des fruits et légumes dans le cas des produits prêts à consommer, doivent avoir une concentration en *E. coli* inférieure à 100 UFC dans 100 ml.

De ces travaux, il ressort également que le maintien d'une concentration cible en ozone (et donc le CT) dans le bac de lavage au cours du temps nécessite une bonne maîtrise de l'installation. Le pétitionnaire propose que le temps de séjour de la salade dans le bac de lavage soit de 30 s et non de 2 min comme testé lors des essais sur ligne semi-industrielle. Diminuer le temps de passage à 30 s en gardant un CT constant implique d'augmenter la concentration en ozone à 1,5 mg/L (concentration cible faisant l'objet de la demande), condition qui n'a pas été testée pendant les essais. Il n'a pas été démontré dans le dossier que ces conditions d'utilisation puissent être maintenues pendant au moins 150 min, ni pendant une durée de production classique.

Par ailleurs, quel que soit l'auxiliaire technologique utilisé (ozone ou chlore), cet essai semi-industriel présente des contaminations microbiennes élevées. Du point de vue microbiologique, le circuit fermé de l'essai semi-industriel n'est peut-être pas représentatif des conditions rencontrées dans une installation industrielle.

En l'absence d'indication sur le taux de renouvellement de l'eau de lavage et la tendance d'augmentation de la charge microbienne des salades observée au bout de 130 min, il n'a pas été démontré si une journée de production reste compatible avec la bonne qualité microbiologique des produits.

### **3.4. Conclusions du GT ESPA et du CES BIORISK**

Le GT ESPA estime que du point de vue toxicologique, dans les conditions décrites dans le dossier de demande, l'utilisation de l'ozone dans l'eau, en tant qu'auxiliaire technologique, pour le lavage des salades prêtes à l'emploi (dites de 4<sup>ème</sup> gamme) ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur.

Le GT ESPA recommande de surveiller les concentrations en bromates dans l'eau du bac de lavage et dans l'eau résiduelle sur les salades par rapport à la limite pour la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine, fixée à 10 µg de bromates/L. Par ailleurs, concernant la sécurité des travailleurs, il est recommandé la mise en place de procédures pour les personnes en poste, proches des bacs de lavage en présence d'eau ozonée (présence de bullage pour augmenter la convection et le cheminement des salades).

Concernant les aspects microbiologiques, dans les conditions testées, les essais tendent à montrer un effet similaire entre un lavage à l'eau ozonée (CT compris entre 0,22 et 0,75 mg.min/L) et un lavage à l'eau chlorée (CT cible de 30 mg.min/L) sur le maintien de la qualité microbiologique des eaux de lavage, en-dessous d'un seuil cible fixé par le pétitionnaire (100 UFC/ml pour les microorganismes aérobies mésophiles). Concernant les salades, la qualité microbiologique par lavage à l'eau ozonée semble être similaire à celle obtenue par lavage à l'eau chlorée. Le CES BIORISK regrette le petit nombre de réplicats et l'absence de certains témoins ce qui ne permet pas de conclure sur la base d'une analyse statistique quant à l'efficacité antimicrobienne du procédé.

## **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du GT ESPA et du CES BIORISK.

**Dr Roger GENET**

**MOTS-CLES**

OZONE, DESINFECTANT, AUXILIAIRE TECHNOLOGIQUE, EAU DE LAVAGE, SALADES 4<sup>ème</sup> GAMME  
OZONE, *SANITIZER, PROCESSING AID, WASHWATER, PACKAGED SALADS*