



HAL
open science

Les disques de Petrifilm™ comme alternative aux milieux de culture pour le diagnostic microbiologique rapide dans les lieux de stockage des documents graphiques

Malalanirina S Rakotonirainy

► To cite this version:

Malalanirina S Rakotonirainy. Les disques de Petrifilm™ comme alternative aux milieux de culture pour le diagnostic microbiologique rapide dans les lieux de stockage des documents graphiques. Support Tracé, 2017, 17, pp.160-166. hal-02986526

HAL Id: hal-02986526

<https://hal.science/hal-02986526>

Submitted on 23 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Les disques de Petrifilm™

comme alternative aux milieux de culture pour le diagnostic microbiologique rapide dans les lieux de stockage des documents graphiques

Malalanirina Sylvia Rakotonirainy*

Les documents d'archives et de bibliothèques sont particulièrement sensibles aux attaques de moisissures. Les dommages engendrés vont de l'aspect inesthétique (duvets, taches colorées) à la dégradation (affaiblissement du papier, cloques, déchirures) du support. Les micro-organismes peuvent provenir des documents eux-mêmes ou de l'environnement (air, surfaces, êtres humains, insectes). La poussière est l'un des principaux responsables car elle véhicule des particules organiques et des micro-organismes dont certains peuvent adhérer aux surfaces et dégrader le

substrat, grâce aux enzymes spécifiques qu'ils produisent. La maîtrise de la biocontamination consiste à prendre des mesures préventives (contrôle des paramètres thermo-hygrométriques, maintenance des locaux et des collections) mais elles sont parfois insuffisantes.

Quand des traces suspectes sont visibles sur les surfaces (meublier, sol, murs, boîtes) et/ou les documents, des prélèvements sont rapidement effectués pour déterminer leur nature. Les méthodes classiquement

* Sorbonne Universités, Centre de Recherche sur la Conservation, CNRS-MNHN-MIC, USR3224, Paris, France

utilisées reposent sur l'écouvillonnage et la mise en culture par un laboratoire spécialisé. Une alternative est l'utilisation des boîtes ou lames de contact contenant un milieu gélosé, que l'on applique directement sur les surfaces à analyser. Ces boîtes et lames ne peuvent être utilisées sur les documents, compte tenu de leur humidité et de la gélose qui peut se décoller et s'accrocher au papier. Ces matériels peuvent être achetés prêts à l'emploi chez les fournisseurs de produits de laboratoire et doivent être stockés dans un réfrigérateur, mais leur durée de stockage est limitée du fait de l'assèchement de la gélose.

Il existe depuis peu un nouveau produit, le Pétrifilm™, dont la durée de conservation est beaucoup plus longue que celle des produits précédemment évoqués, et qui ne nécessite pas, lorsque le paquet n'est pas ouvert, un stockage au frais. L'objectif de cette étude est d'évaluer les Petrifilms™ « levures et moisissures », pour le diagnostic rapide de l'état de contamination fongique d'une surface ou d'un document et leur utilisation dans le cadre d'une décontamination.

Les disques de Petrifilm™

Le Petrifilm™ est composé de deux films : le premier, d'une surface d'environ 28 cm², contient un milieu de culture déshydraté auquel est ajouté un agent gélifiant hydrosoluble à froid ; le second, qui couvre le premier, est un film de polyéthylène contenant un indicateur coloré qui permet de créer un meilleur contraste, facilitant ainsi la différenciation des colonies qui s'y développent et leur dénombrement.

Il y a deux manières d'employer les Petrifilms™ : soit par application directe sur la surface à échantillonner, après une réhydratation préalable du film de base contenant le milieu de culture, soit par écouvillonnage et ensuite mise en suspension de l'échantillon avant son dépôt sur le film de base. Dans ce second cas, il est possible de recourir à différents types de solutions pour réaliser la suspension.

La solution de Lethen est souvent utilisée avec les Petrifilms™ pour neutraliser les traces de désinfectants qui auraient pu être précédemment appliqués sur la surface à analyser. Cette solution est composée principalement de peptone, d'extrait de viande, de lécithine et de chlorure de sodium. Elle peut être achetée seule ou dans un système contenant un écouvillon trempé dans la solution. Quoique la solution de Lethen puisse être conservée entre 5 et 25 °C, il est préférable de la stocker au frais pour une meilleure conservation. Par

ailleurs, elle a une date limite, ce qui peut être contraignant pour les utilisateurs. Nous avons donc comparé l'efficacité du Lethen avec celle de l'eau distillée stérile et du sérum physiologique (chlorure de sodium à 0,90 %).

Partie expérimentale

La solution de Lethen utilisée (Société Grosseron) se présente dans un tube de 10 ml, avec 1,3 ml de solution et un écouvillon plongé dans le tube en contact avec la solution. Nous nommerons ce type d'écouvillon « E-leth ».

Les échantillons à tester sont prélevés à l'aide d'écouvillons E-leth ou d'écouvillons secs classiques que l'on appellera « E-sec ». Ils sont ensuite mis en suspension dans la solution de Lethen, l'eau stérile ou le sérum physiologique. Les suspensions sont étalées soit sur les Petrifilms™, soit sur un milieu de culture malt-agar (MA) en boîte de Pétri de 90 mm. Pour tous les tests, après une semaine d'incubation à température ambiante, on note l'aspect visuel et on apprécie approximativement la quantité de colonies développées (analyse semi-quantitative) ou on les dénombre individuellement quand cela est possible (analyse quantitative). Les résultats sont alors exprimés en nombre d'unités formant colonie (UFC) par ml. Tous les tests sont réalisés en trois exemplaires et reproduits une seconde fois de la même manière.

Évaluation des Petrifilms™ sur une souche connue

Dans un premier temps, nous avons comparé les Petrifilms™ avec un milieu MA en utilisant une suspension de spores de *Penicillium frequentans*. La suspension est préparée à partir d'une culture stock en boîte de Pétri. On gratte la surface de la culture et on introduit l'échantillon dans un tube d'eau stérile. Cette suspension mère (SM) est dénombrée avec une cellule de malassez et ajustée pour avoir une concentration finale de 10⁵ spores/ml. La solution SM est utilisée telle quelle, ou diluée dans l'eau pour avoir une concentration finale de 100 spores/ml (S1) puis 1 ml est étalé sur les Petrifilms™ ou le milieu MA.

Contrôle de l'état de contamination des surfaces

Les prélèvements sont réalisés sur des surfaces planes poussiéreuses avec les écouvillons E-leth ou E-sec, en frottant en zigzag dans les deux sens, sur une surface déterminée à l'aide d'un gabarit de 5 cm x 2 cm (10 cm²) que l'on fait soi-même. Les écouvillons sont ensuite

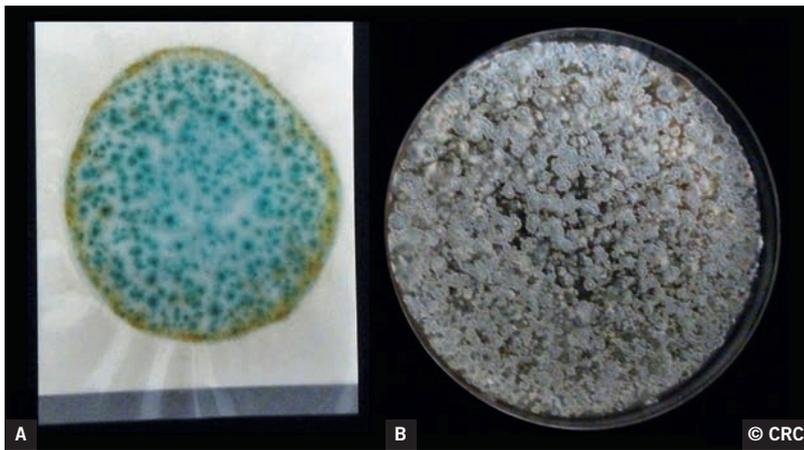


Figure 1. Colonies développées sur (A) un Petrifilm™ et (B) un milieu malt-agar, à partir de 1 ml de suspension de spores (solution mère) de *Penicillium frequentans* à 10^5 spores/ml.

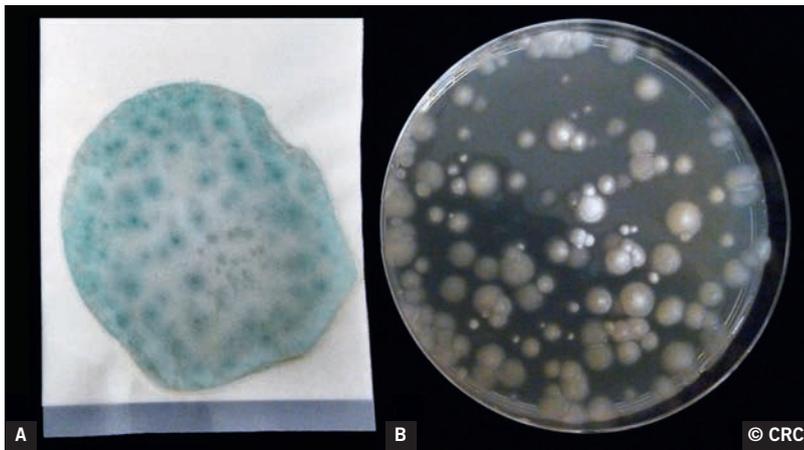


Figure 2. Colonies développées sur (A) un Petrifilm™ et (B), un milieu malt-agar, à partir de 1 ml de suspension de spores S1 de *Penicillium frequentans* à 100 spores/ml.

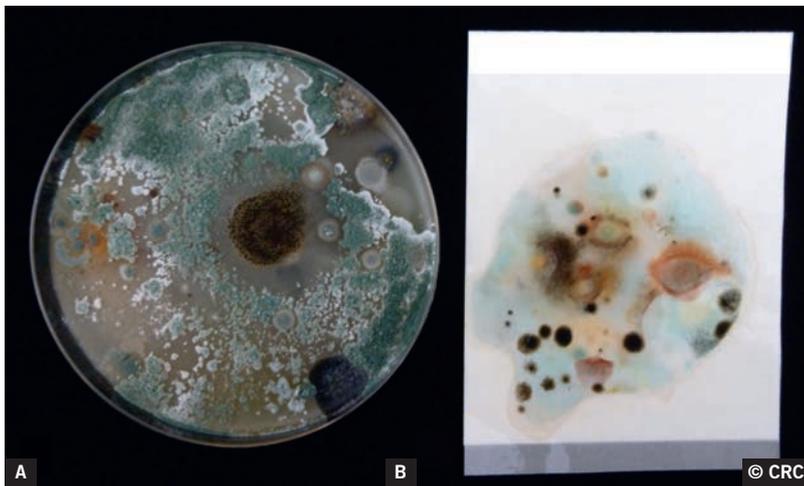


Figure 3. Colonies développées sur (A) un milieu malt-agar et (B) un Petrifilm™ à partir de prélèvements réalisés avec le système Lethen.

introduits dans les différentes solutions avant étalement sur les Petrifilms™ ou sur les milieux de culture. Aucune norme n'existe dans le domaine du patrimoine en ce qui concerne la contamination des surfaces. Mais sur la base de plusieurs études de terrain, la Bibliothèque nationale de France a défini la valeur de

50 UFC/dm² comme valeur limite à ne pas dépasser. Rapportée à notre surface de prélèvement dans le cas présent (10 cm²), nous avons donc considéré les prélèvements comme positifs si le nombre de colonies développées était supérieur à 5.

Évaluation de l'efficacité d'un nettoyage

Quand un rayonnage est poussiéreux, il présente un risque pour les documents conservés. Le premier geste est souvent de dépoussiérer. Il en est de même des documents présentant des taches de contaminations anciennes. Nous avons évalué l'utilité des Petrifilms™ pour contrôler le nettoyage. Des prélèvements par écouvillonnage ont été effectués avant et après nettoyage des surfaces à l'aide d'un simple chiffon sec. Ils ont également été réalisés sur des documents présentant des taches de contaminations fongiques, avant et après leur nettoyage par gommage. Les échantillons ont ensuite été mis en suspension dans les différentes solutions décrites puis mis en culture sur les Petrifilms™.

Résultats

Évaluation des Petrifilms™ sur *Penicillium frequentans*

L'étalement de 1 ml de la solution mère (SM) de *Penicillium frequentans* à 10^5 spores/ml permet d'avoir un tapis dense de colonies vert-gris-bleu à la surface du milieu MA et également sur les Petrifilms™ où les colonies de la moisissure se présentent sous forme de petites taches colorées bleues (fig. 1).

Quand on étale 1 ml de la solution diluée S1 (théoriquement de 100 spores/ml) sur les Pétrifilms™ et les milieux MA, le nombre de colonies développées

est similaire, on obtient respectivement en moyenne $101 \pm 20,5$ UFC/ml et 105 ± 15 UFC/ml (fig. 2). On note que sur les deux milieux, les colonies sont plus étendues que dans le cas de la solution mère car elles ont plus de place pour se développer. Moins il y a de colonies, plus elles sont larges.

Contrôle de l'état de contamination des surfaces

Prélèvements avec les écouvillons humides du système Lethen

L'écouvillon E-leth est sorti de la solution de Lethen dans laquelle il est plongé, puis égoutté légèrement avant de l'appliquer sur les surfaces. L'écouvillon avec l'échantillon prélevé est replongé dans la solution de Lethen pour mettre les micro-organismes récoltés en suspension. Les suspensions ainsi réalisées sont étalées sur les Petrifilms™ et les milieux de culture.

Pour une surface de 10 cm², on obtient, en moyenne, 29 ± 5 UFC/ml sur les milieux MA et $30,3 \pm 1,5$ UFC/ml sur les Petrifilms™ (fig. 3). Par ailleurs, les témoins sans échantillon sont négatifs, aucun développement n'est obtenu aussi bien sur les Petrifilms™ que sur les milieux MA, les solutions de Lethen sont donc exemptes de toute contamination.

Prélèvements avec les écouvillons secs

Les prélèvements sur les surfaces sont réalisés avec des écouvillons secs « E-sec » sans humidification. Les échantillons récoltés sont mis en suspension dans la solution de Lethen, l'eau stérile ou le sérum physiologique, puis étalés sur les Petrifilms™ ou les milieux MA. Les trois solutions donnent des résultats équivalents. On confirme ce que l'on a observé précédemment, à savoir que le nombre de colonies développées sur les Petrifilms™ est similaire à celui des milieux MA (fig. 4). Cependant, pour la solution de Lethen, on constate que le nombre de colonies obtenu avec les écouvillons secs est un peu plus faible qu'avec les écouvillons humidifiés (fig. 5).

Les témoins sans échantillon ne présentent là non plus aucun développement fongique après incubation.

Évaluation de l'efficacité d'un nettoyage de surfaces

Les prélèvements sont réalisés avec des écouvillons secs « E-sec » sans humidification ou avec les écouvillons humidifiés « E-Leth », sur des surfaces, avant et après dépoussiérage avec un

chiffon sec. Les échantillons prélevés sont mis en suspension dans les différentes solutions, puis étalés sur les Petrifilms™. Après dépoussiérage, les résultats sont négatifs quelle que soit la solution utilisée (fig. 6).

Nous avons réalisé les mêmes tests sur un document présentant des traces de contaminations fongiques

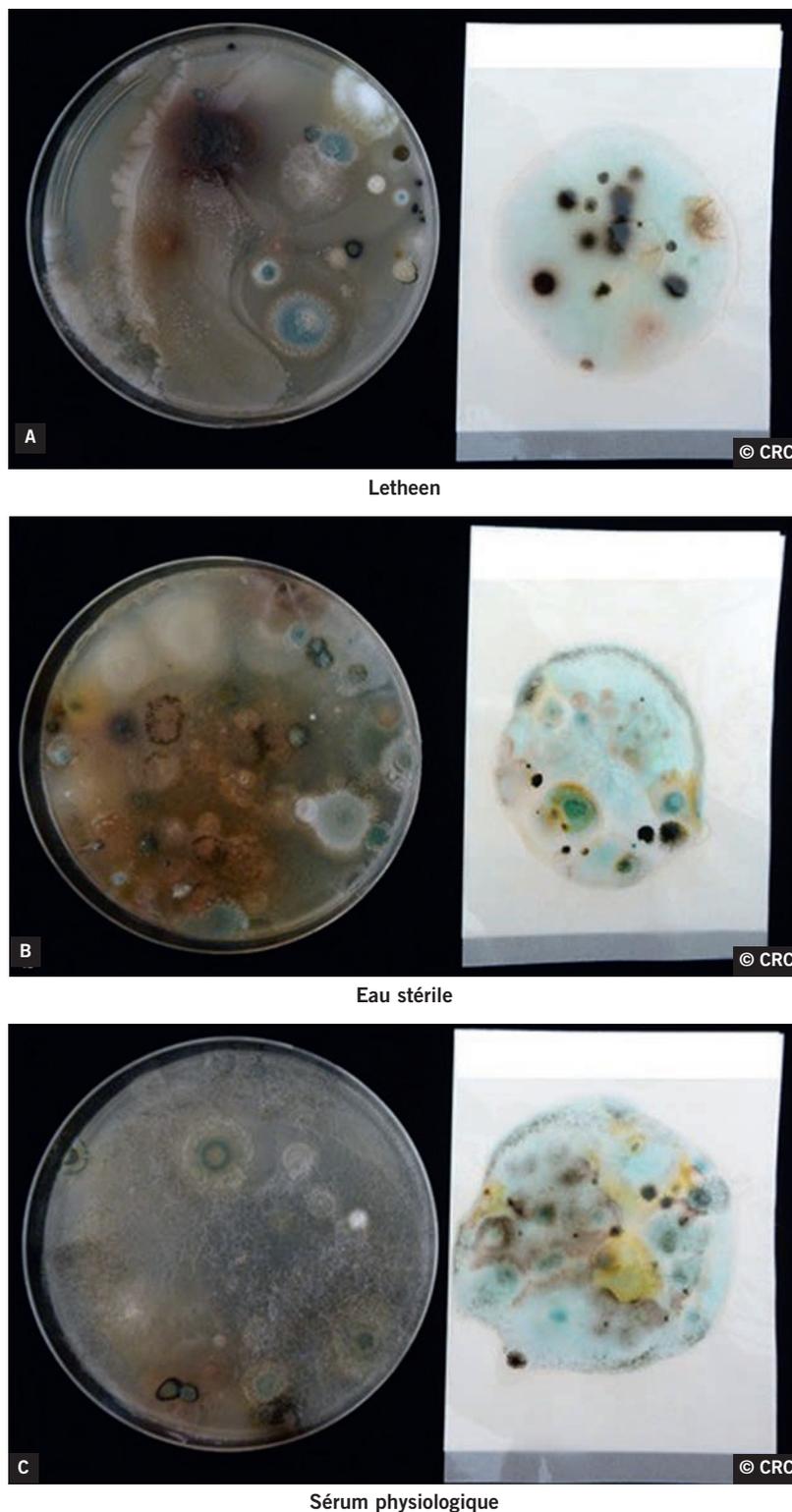


Figure 4. Comparaison de l'importance des colonies développées à partir d'échantillons prélevés avec des écouvillons secs et mis en suspension dans les différentes solutions : (a) Lethen, (b) eau stérile ou (c) sérum physiologique.

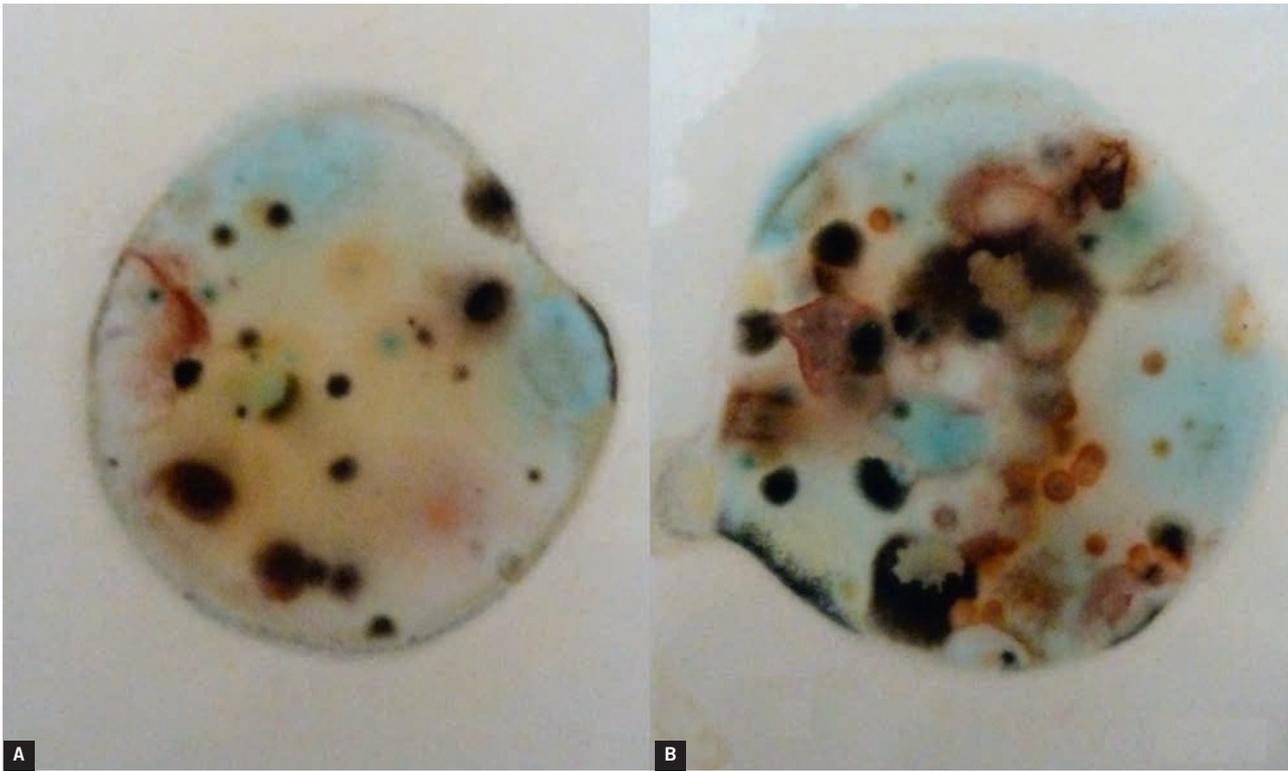


Figure 5. Comparaison des résultats obtenus avec la solution de Lethen, entre des prélèvements avec (A) un écouvillon sec et (B) un écouvillon humide.

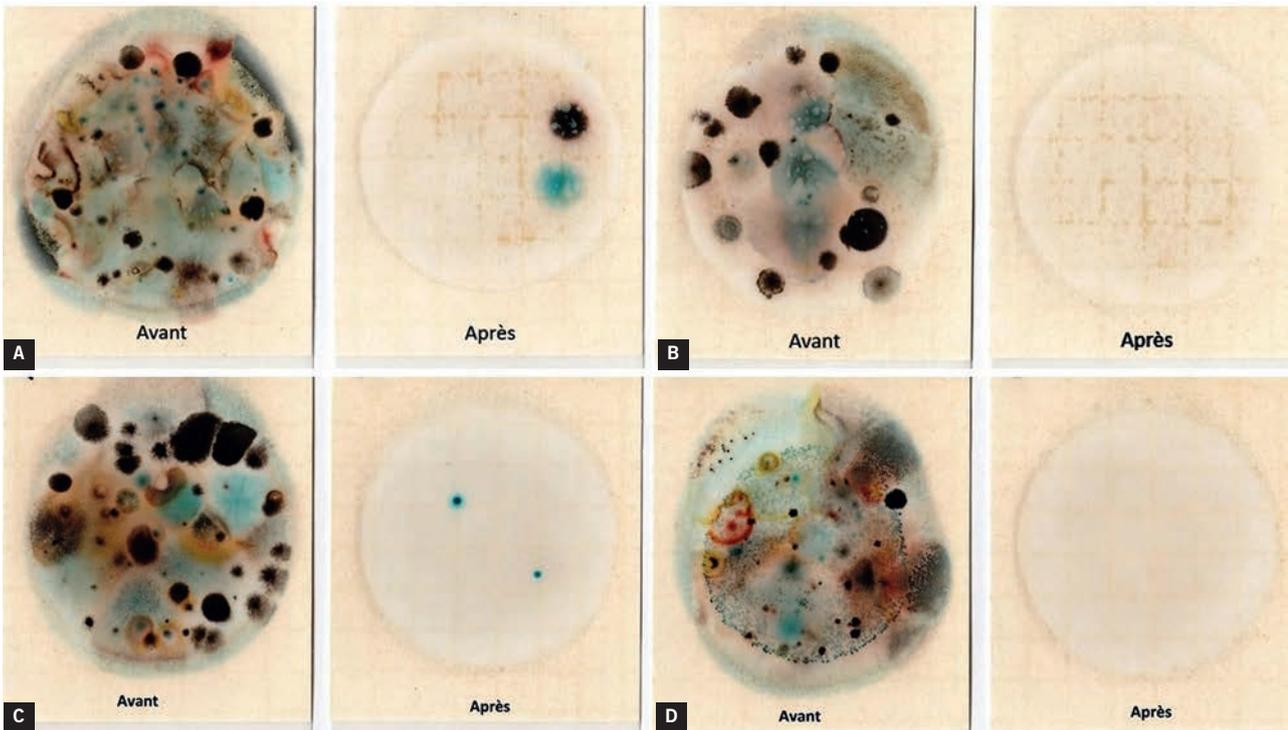


Figure 6. Comparaison des développements sur Petrifilms™, de prélèvements avant et après dépoussiérage de surfaces poussiéreuses, sur des échantillons prélevés avec des écouvillons humides ou secs et remis en suspension dans les différentes solutions testées ; (A) écouvillons humides E-leth dans la solution de Lethen, (B) écouvillons secs dans la solution de Lethen, (C) écouvillons secs dans l'eau stérile et (D) écouvillons secs dans le sérum physiologique.



Figure 7. Document contaminé avant et après un nettoyage par gommage.



Figure 8. Développement sur Petrifilms™ de prélèvements par écouvillonnage à sec sur un document (1) avant et (2,3) après 2 gommages successifs.

(fig. 7). Après un premier gommage du document, on note une diminution conséquente du nombre de colonies développées. Cependant, il reste des colonies vivantes. Il faut un second gommage pour réduire totalement le nombre de colonies. Ce qui démontre l'utilité du système pour contrôler l'efficacité d'une décontamination (fig. 8).

Conclusion

Étant donné la masse de documents graphiques à conserver, nous sommes toujours à la recherche de solutions simples pour évaluer rapidement le niveau de contamination fongique des rayonnages, des boîtes d'archives ou des documents. Jusqu'à présent, les prélèvements

étaient réalisés par écouvillonnage et envoyés à un laboratoire spécialisé. Les mesures correctives pour stopper le développement des moisissures ne pouvaient être entreprises qu'à la lumière des résultats obtenus par le laboratoire et donc parfois plusieurs semaines après les prélèvements.

Nous avons montré dans cette étude que l'utilisation des disques de Petrifilm™, avec une méthode par frot-tis, permet le diagnostic rapide de l'état de contamination des surfaces et apparaît comme une alternative simple aux méthodes microbiologiques conventionnelles. Les écouvillons humidifiés donnent de meilleurs rendements, mais ceux des écouvillons secs sont également satisfaisants, ce qui permet d'appliquer le système aux documents. Les échantillons prélevés peuvent être mis simplement en suspension dans du sérum physiologique, en faisant à chaque fois un témoin sans prélèvement.

À température ambiante, les colonies sont observables dès 72 h sur les Petrifilms™ mais il est préférable de les laisser plus longtemps car certaines souches sont plus longues à se réactiver. Faciles à stocker, ne prenant pas de place, le coût des Petrifilms™ est en plus un élément non négligeable : chaque disque revient en moyenne à 1,20 €. Il est bien évident que ce système donne une évaluation de la contamination mais ne permet pas d'identifier les souches. Il a cependant le triple avantage de s'affranchir d'un laboratoire spécialisé, d'avoir des résultats très rapidement et de permettre une analyse quantitative si on souhaite connaître le taux de contamination. Précisons que le plus important n'est pas d'avoir des valeurs absolues mais d'apprécier le niveau de contamination pour agir rapidement en cas de besoin. Pour une surface de 2 cm x 5 cm, au-dessus de 5 colonies développées par Petrifilm™, nous estimons qu'il y a présence d'une contamination et, suivant son degré, il est nécessaire de prendre des mesures correctives adaptées. Par rapport aux lames gélosées, son avantage est celui de l'écouvillonnage qui permet d'échantillonner des surfaces non planes et/ou d'accès difficile ainsi que des documents. Ce système sera surtout utile pour contrôler rapidement l'efficacité d'un dépoussiérage en réalisant des prélèvements avant et après l'opération.

Résumé

Quand des traces suspectes sont visibles sur les documents et/ou les surfaces, des prélèvements doivent être rapidement effectués pour déterminer leur viabilité. Les méthodes d'analyses microbiologiques classiques reposent sur l'écouvillonnage et la mise en culture des échantillons récoltés par un laboratoire spécialisé. Ceci demande plus de travail et de temps. L'utilisation de Petrifilm™ est une alternative intéressante, facile à mettre en œuvre par un non-spécialiste, donnant des résultats très rapidement et peu coûteuse. Les Petrifilms™ sont des films à base de milieu de culture gélosé déshydraté. Avec des suspensions de spores de *Penicillium frequentans* à des concentrations connues, nous avons démontré que le nombre d'unités formant colonie (UFC) par ml obtenu sur des Pétrifilms « levures et moisissures » est équivalent à celui obtenu sur un milieu malt-agar en boîte de Pétri. Leur utilisation est tout à fait appropriée pour évaluer l'efficacité d'un nettoyage des surfaces et des documents.

Abstract

When suspicious traces are visible on documents and / or surfaces, samples must be taken quickly to determine their viability. Traditional microbiological analytical methods rely on swabbing and culture of harvested samples by a specialized laboratory. This takes more work and time. The use of Petrifilm™ is an interesting alternative, easy to implement by a non-specialist, giving results very quickly and inexpensive. The Petrifilms™ are films based on dehydrated agar culture medium. With suspensions of spores of *Penicillium frequentans* at known concentrations, we demonstrated that the number of colony forming units (CFU) per ml obtained on "yeast and mold" Petrifilms is equivalent to that obtained on a malt-agar medium in Petri dish. Their use is quite appropriate for evaluating the cleaning effectiveness of surfaces or documents cleaning.