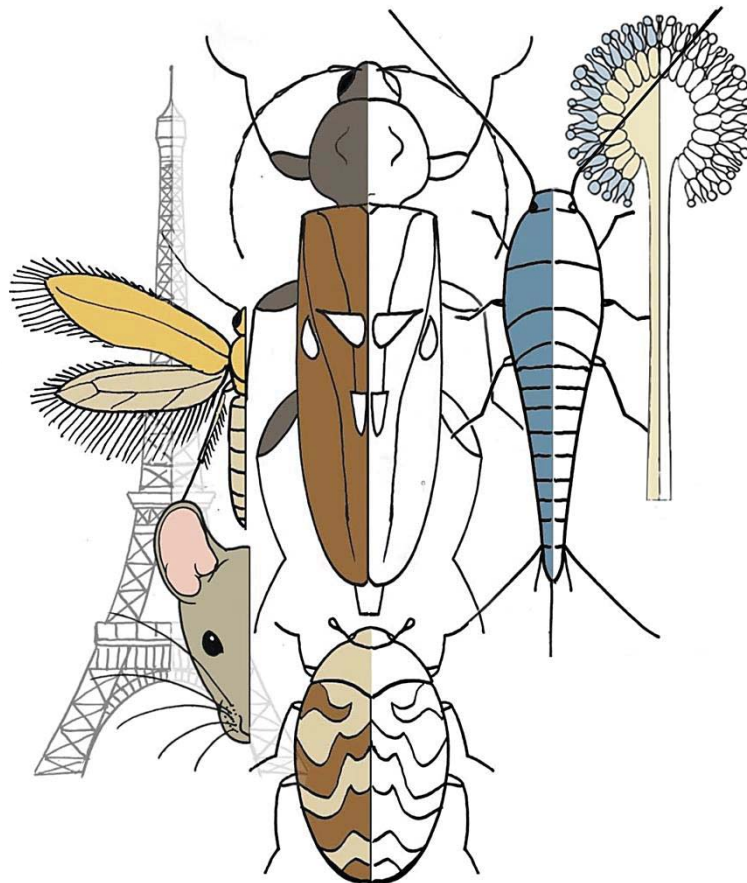


# IPM 2016

**3rd international IPM Conference in Museums, Archives,  
Libraries and Historic Buildings**

13-15 September 2016  
Auditorium of the Louvre Museum, Paris



**3e colloque international sur la Gestion intégrée des  
contaminants biologiques (IPM) dans les musées,  
archives, bibliothèques et demeures historiques**

Du 13 au 15 septembre 2016  
Auditorium du musée du Louvre, Paris

## Evaluation des risques de contamination micro-biologique

---

Alain Roche\*, Sébastien Gilot

LARCROA, Paris, France

\*Corresponding author: a.roche@larcroa.fr

Il est inexact de croire qu'une mesure de l'humidité relative extérieure à une boîte d'archives ou à une liasse de documents suffit à évaluer les risques de contamination biologique.

Les papiers, les cuirs, les textiles sont des matériaux hydrophiles qui absorbent et désorbent l'eau de manière à se maintenir en équilibre par rapport à leur environnement immédiat. Ce faisant ils suivent des courbes de sorption / désorption qui leur est propre.

Le matériau dominant en milieu d'archives et de bibliothèque est le papier et c'est donc sur ce matériau que nos réflexions se sont portées. A partir des études de biocontamination que nous avons menées dans différents magasins d'archives départementales, nous avons mis au point une méthode qui permet de déterminer l'impact du climat sur le développement des microorganismes à l'intérieur d'une boîte d'archives, d'une liasse de documents ou d'un livre.

C'est en partant des mesures d'humidité relative et de température à l'extérieur et à l'intérieur d'un document que nous pouvons déterminer la teneur en eau dans le document. Quand la teneur en eau est égale ou supérieur à l'activité en eau d'une espèce donnée nous avons pu vérifier que dans x% des cas l'espèce fongique se développe. L'humidité relative ambiante n'est pas un paramètre suffisant pour estimer la teneur en eau d'un matériau. Des décalages et des lissages peuvent avoir lieu en fonction de l'absorptivité des matériaux et de leur confinement / concentration. Dans le cadre d'une gestion intégrée, il est donc important de comprendre et de prendre en compte le facteur essentiel d'identification et de contrôle des risques microbiologiques qu'est le contenu en eau du matériau.

Keywords: Biocontamination - Climat - Activité en eau - Matériaux hydrophiles

## Introduction

Depuis plus de 10 ans le LARCROA propose des missions d'évaluation de biocontamination dans des magasins d'archives, bibliothèques, médiathèques, réserves de musées et monuments historiques.

Dans la plupart des missions qui nous ont été confiées, notre objectif a été dans un premier temps d'identifier les causes de la contamination biologique avant d'en évaluer l'importance et de préconiser des solutions de décontamination et de conservation.

Pour identifier les causes de contamination nous proposons selon les cas de figure, une étude du climat environnemental sur plusieurs mois, des mesures ponctuelles de l'hygrométrie et de la température, des mesures de débit d'air et représentation aéraulique dans le cas où les magasins ou réserves sont équipés de CTA. Nous évaluons aussi l'état sanitaire du bâtiment par thermographie et des mesures de teneur en eau dans les murs, sols et plafond.

En ce qui concerne l'évaluation de la contamination microbiologique sur les documents nous faisons une cartographie basée sur une observation visuelle et un tirage aléatoire selon la norme NF Z40-011. Sur chaque site, les prélèvements sur écouvillons, languettes et prises d'air sont répartis en fonction des observations réalisées lors de la phase de cartographie, dans le but d'évaluer au mieux les différents types de biocontamination. Afin de modéliser au mieux les conditions de reviviscence des échantillons, ils sont mis en culture sur différents milieux.

Les observations que nous avons faites au cours de ces missions nous ont mené à nous poser un certain nombre de questions et inciter à mettre en place cette étude.

## Propriétés des papiers

*Teneur en eau ( $T_w$ )* : Quand un papier est immergé dans un milieu humide il absorbe de l'eau selon l'humidité relative<sup>1</sup> ambiante et en milieu sec il désorbe. La teneur en eau caractérise la quantité d'eau absorbée par le papier. Elle s'exprime en %. La teneur en eau s'obtient à partir d'une courbe isotherme de sorption d'eau du papier, fig.1. Elle dépend de la température.

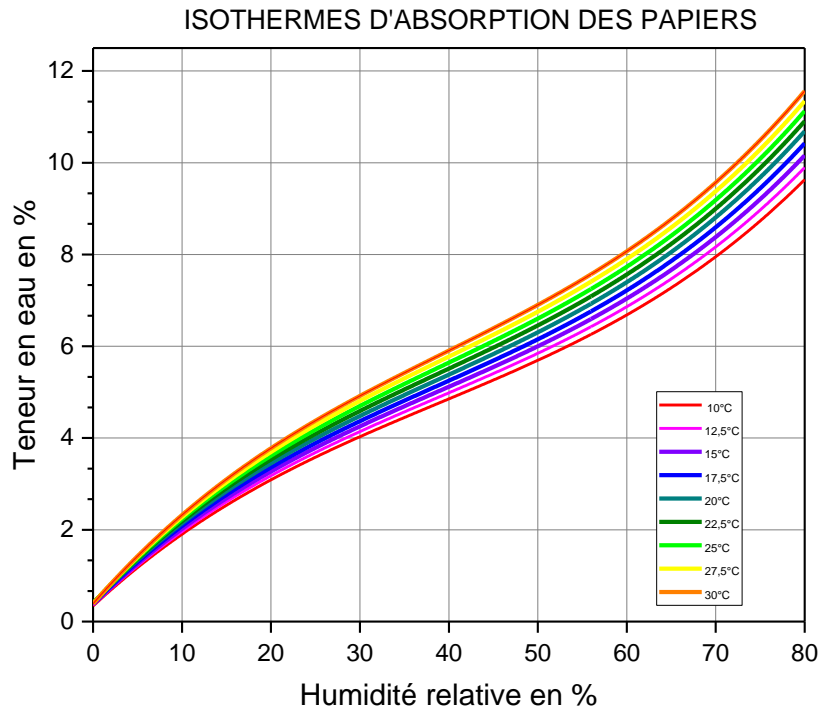


Fig.1 : Isothermes d'absorption en eau d'un papier.

La teneur en eau s'obtient aussi par l'expression suivante :

$m_w$  : masse du papier humide  
 $m_{anh}$  : masse du papier anhydre.

$$T_w = \frac{m_w - m_{anhydre}}{m_{anhydre}} \times 100$$

<sup>1</sup> L'humidité relative correspond au rapport de la quantité de vapeur d'eau ou HA pour un volume sur la quantité de vapeur d'eau à saturation pour un même volume.

*Diffusion de l'eau.* Le processus de diffusion transitoire de l'humidité<sup>2</sup> dans le papier est considéré comme linéaire, unidimensionnel et homogène et répond à la loi de Fick.

$$\frac{\partial^2 \theta_i}{\partial z^2} = \frac{1}{D_i} \frac{\partial \theta_i}{\partial t}, z \in [z_i, z_{i+1}, \dots] (i = 1, 2, \dots, M)$$

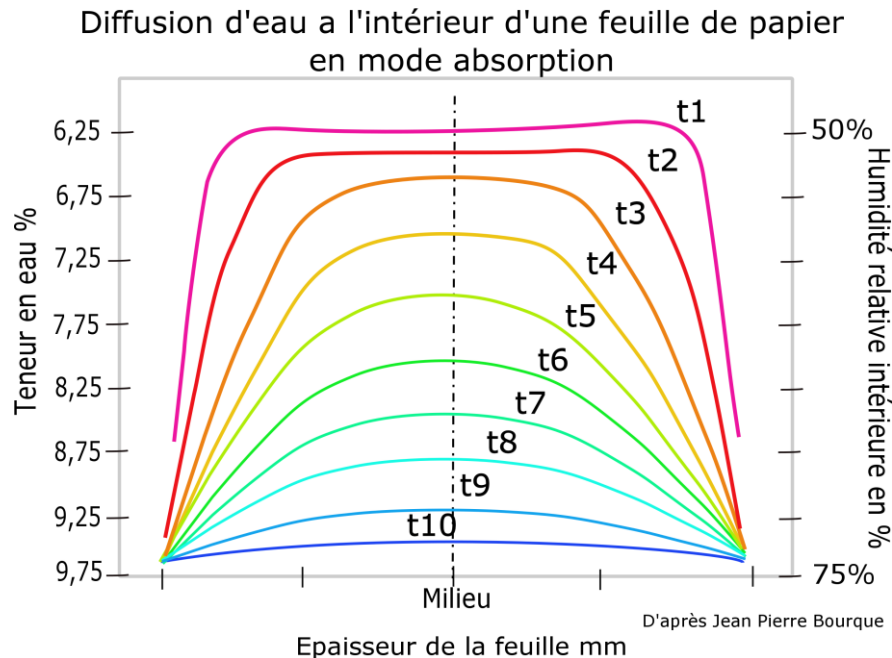


Fig.2 : Courbes de diffusion de l'eau dans l'épaisseur du papier

Quand une feuille de papier passe rapidement d'une humidité de 50% de *HR* ( $T_w = 6,25\%$ ) à 75% *HR* ( $T_w = 9,75\%$ ) on remarque que la teneur en humidité au centre de la feuille ( $z = 0$ ) est inférieure à la teneur en humidité aux surfaces externes et ce, pour tout le processus de diffusion précédent l'état stationnaire ( $t = 10$ ).

On considérera que cette loi est valable pour un ensemble de feuillets réunis en ramette ou en liasse et qu'il se comportera comme une feuille très épaisse.

## Dispositif expérimental.

*Corps d'éprouvette.* Il est composé d'une boîte d'archives A+B standard de dimensions : 10/34/24,5 cm. Le poids de la boîte vide est de 143g

Le contenu de la boîte d'archives est :

- Enveloppe contenant des documents papier 1: poids 685 g
- Enveloppe contenant des documents papier 2: poids 371 g
- Ramette de papier A4 blanc 80g/m<sup>2</sup> instrumentée : poids sans le capteur 934 g.
- Enveloppe contenant des documents papier 3: poids 378 g

<sup>2</sup> Hypothèses : Pas de génération d'humidité à l'intérieur de la feuille, coefficient de diffusion et masse volumique indépendant de  $T_w$ , l'humidité extérieure maintenue constante, coefficients de transfert convectifs sont uniformes et constants.

- Enveloppe contenant des documents papier 4: poids 394 g

Masse totale de papier : 2762g et 2905g avec la boîte d'archives.

*Tests fongiques.* Des papiers tests ont été introduits dans la boîte d'archives.

- Papier A : vergé, pâte chiffon, empoussiéré, sans traces de développements fongiques.
- Papier B : vergé, pâte chiffon, non empoussiéré, nombreuses piqûres de type foxing, sans traces de développements fongiques.
- Papiers modernes 27, 45, vélin 80g/m<sup>2</sup>, artificiellement contaminé par remise en suspension d'espèces fongiques en culture au laboratoire et issues d'une étude en cours. Le protocole de contamination est le suivant : inondation des milieux par 100mL d'une solution osmotique de NaCl 0,09%. Homogénéisation au vortex et pulvérisation sur les papiers tests.

*Contrôle de l'humidité et de la température.* Trois enregistreurs TESTO174 sont installés dans le dispositif expérimental :

- 16a à l'intérieur de la ramette de papier, fig.3.
- 17a à l'intérieur de la boîte d'archives, fig.4
- 18a dans l'étuve ventilée servant de de chambre humide.



Fig.3 : insertion mini capteur HR/T dans ramette papier



Fig.4 : Mini capteur HR/T dans boîte d'archives

L'enregistreur thermo hygrométrique TESTO 174 16a est inséré dans une cavité creusée dans la ramette de papier située au centre du dispositif.

*Chambre humide.* Dans une étuve ventilée Memmert l'humidité relative de 85% est obtenue grâce à la présence de quatre bacs remplis d'eau, fig.5. Nous avons choisi de réguler la température à 25°C car c'est la température imposée pendant la mise en culture sur milieu des prélèvements de microorganismes.



Fig.5 : Chambre humide et mini capteur HR/T

## Protocole expérimental.

*Absorption du papier* : Le corps de mesure ou boîte d'archives a été soumis à une humidité de  $85\% \pm 2\%$  HR pendant 800 heures. La température est maintenue constante. La cadence de mesures étant de 10 minutes on a au total 9600 valeurs d'hygrométrie pour chaque enregistreur. Comme la température est constante et maintenue à  $25^{\circ}\text{C}$  nous n'en tiendrons pas compte.

Pour l'évaluation de la teneur en eau dans les papiers contenus dans les boîtes d'archives, on prend comme référence une feuille de papier A4 répondant à la norme ISO 16245. Dans tous les cas de figure on considère que les dimensions des papiers ou feuillets contenus dans les boîtes d'archives sont constantes.

La masse de ce papier anhydre est de 4,75 g ce qui correspond à une masse surfacique de  $80\text{g/m}^2$ . Ce même papier immergé dans une humidité ambiante de 50% HR à  $20^{\circ}\text{C}$  a une teneur en eau de 5,25%.

La masse d'une feuille A4 ISO 16245 dans les conditions normales de conservation à 50% et  $20^{\circ}\text{C}$  est de :

$$m_w = m_{anh} + \frac{T_w \times m_{anh}}{100} = 4,75 + \frac{5,75 \times 4,75}{100} = 4,999 \approx 5\text{g}$$

Dans une boîte d'archives composée de plusieurs feuillets l'humidité traverse le papier peu à peu par absorption et vient imprégner chaque feuillet. Quand on prend une mesure entre deux feuillets de papier les valeurs d'humidité relative à l'extérieur et à l'intérieur sont différentes ce qui confirme le processus de diffusion de l'eau dans le papier selon Fick.

Si l'humidité à l'extérieur de la ramette est supérieure à l'humidité à l'intérieur, on est en mode d'absorption et si  $HR_{ext} < HR_{int}$  on est en mode désorption, fig.6.

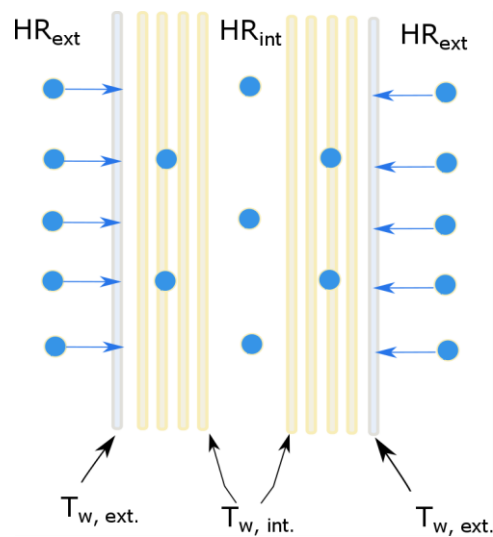


Fig.6 : Schéma du transfert d'humidité dans une liasse de papier

Si  $HR_{ext} = HR_{int}$  on est dans un état d'équilibre ou stationnaire qui ne peut se produire que si les conditions climatiques ( $HR$  et  $T$ ) sont parfaitement stables et au bout d'un temps suffisamment long.

Un essai complémentaire d'absorption d'eau a été mené par pesées des papiers A1, B1, A2, B2, 27, 45.

*Tests de contamination biologique* : Chaque papier est coupé en deux moitiés réparties dans la boîte d'archives :

- A1, B1 sont insérés en début de pile, à proximité de la paroi intérieure de la boîte.
- A2, B2 sont insérées au centre de la pile, au contact de la sonde 16a.
- 27, 45 sont insérées au centre de la pile, au contact de la sonde 16a (les échantillons sont doublés).

Des languettes de papier sont régulièrement découpées et réservées pour mise en culture après pesée. Les prélèvements ont lieu à :

- J0 et J27 pour les papiers A et B
- J0 ; J9 ; J13, J17 et J27 pour les papiers 27 et 45.

La surface des languettes tests est fixée à  $5\text{cm}^2$  ( $5 \times 1\text{cm}$ ) pour les papiers A et B et à  $8\text{cm}^2$  ( $4 \times 2\text{cm}$ ) pour les papiers 27, 45.

Les mises en culture sont réalisées par prise d'empreinte sur lames contact DRBC (*Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol*) et mises en culture 14 jours en enceinte thermo régulée à  $25^\circ\text{C}$ . Le milieu utilisé permet d'inhiber le développement des bactéries et de limiter la prolifération des moisissures envahissantes. Il est adapté aux espèces nécessitant une activité en eau  $A_w$  minimale de croissance de 0,95.



## Interprétation des résultats.

*Absorption en eau des papiers* : Nous avons regroupé les valeurs de HR enregistrées par les trois capteurs sous forme d'un graphique regroupant les courbes d'humidité relative lissées et de teneur en eau dans le papier. La température constante est de 25°C, fig.7.

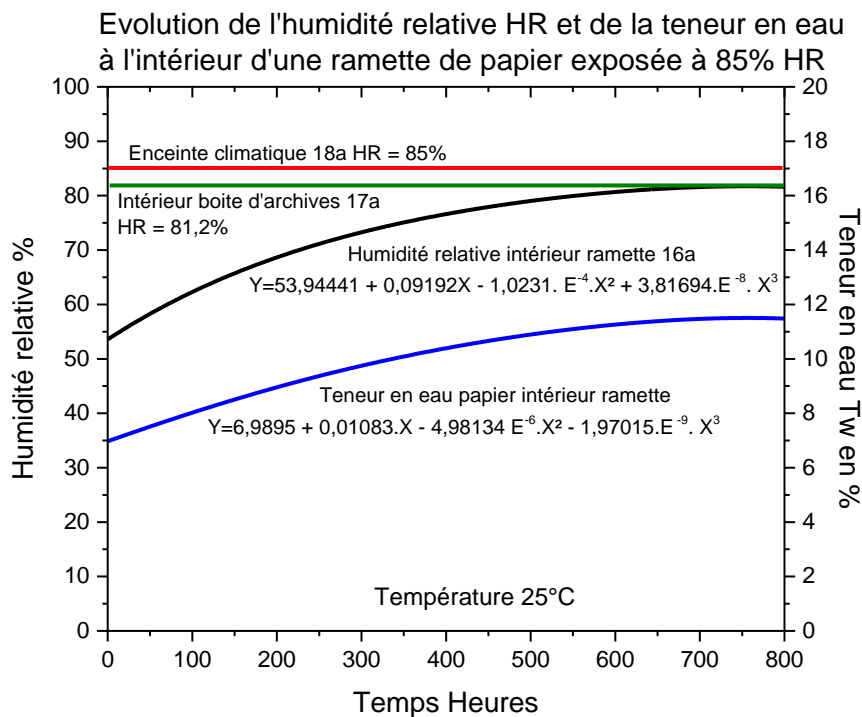


Fig.7 : Courbes d'humidité et de teneur en eau.

La courbe d'absorption en eau du papier est décrite par une fonction polynomiale du troisième ordre. Elle tend vers la valeur d'humidité à l'intérieur de la boîte d'archives: 81,2% HR.

Au temps  $t=0$  l'humidité dans la ramette est de 54,1% HR et la teneur en eau dans le papier est de 7,03%.

Les courbes augmentent régulièrement pour atteindre les valeurs critiques de germination et de croissance des espèces fongiques xérotolérantes:

- à 225 heures 70% HR ou 9,45% de teneur en eau
- à 345 heures 75% HR ou 9,98% de teneur en eau
- à 555 heures 80% HR ou 10,95% de teneur en eau.

Entre 555 h et 800 h la fin de l'expérience l'humidité dans la ramette n'augmente que de 1,5% HR.

Le cœur de la ramette a été maintenu :

- à plus de 70% HR et 25°C pendant 575 heures (23j)
- à plus de 75% HR et 25°C pendant 455 heures (18j)
- à plus de 80% HR et 25°C pendant 245 heures (10j)

La variation de la masse des papiers tests en fonction du temps dans un milieu à 85% HR est donnée pour A1, B1, A2, B2, 27, 45 par rapport à la masse à t0 par les courbes suivantes, fig.8.

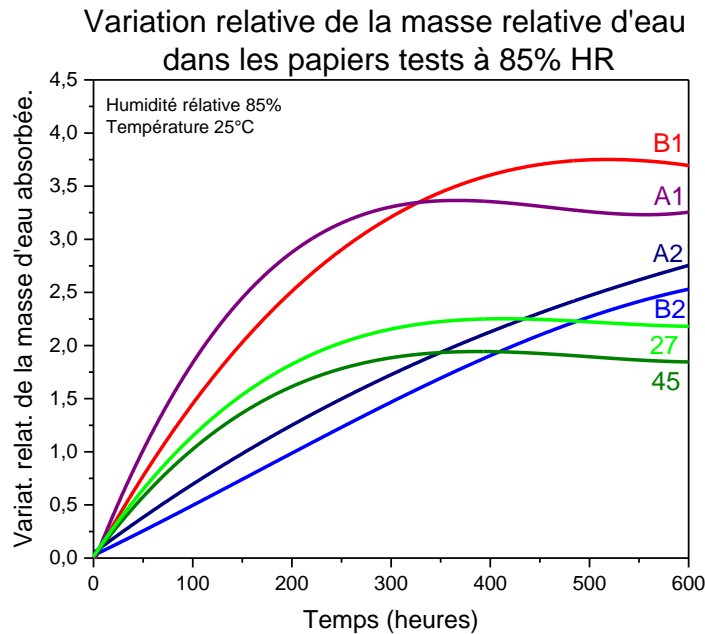


Fig.8 : Variation relative de la masse des échantillons papier.

On voit qu'en fonction de l'emplacement des échantillons dans la boîte, la vitesse d'absorption en eau et la quantité d'eau absorbée sont différentes. Les échantillons A1, B1 positionnés à proximité de la paroi de la boîte atteignent un seuil d'absorption entre 300 et 400 heures. Les échantillons A2, B2 continuent d'absorber de l'eau après 600 heures, et les masses sont bien corrélées à l'augmentation de la teneur en eau dans la ramette. Les échantillons 27, 45 par contre semblent atteindre leurs seuils vers 200 heures avec une quantité d'eau absorbée plus faible.

*Biocontamination.* Du point de vue fongique, l'ensemble des conditions environnementales nécessaires à la germination et à la croissance des espèces semblent réunies. On constate néanmoins avec étonnement qu'après 35 jours d'expérience, dont (10) jours au-dessus de 80% à l'intérieur de la ramette, aucune colonie n'est identifiable visuellement sur les papiers tests. Le dépouillement de l'ensemble des comptages après mise en culture peuvent nous aider à mieux comprendre la situation.

Le comptage des échantillons A et B, fig.9, montre une faible influence de la position des papiers tests dans la boîte. Il semble que la reviviscence des espèces fongiques soit défavorisée au milieu de la ramette (échantillons A2, B2) et favorisée en périphérie de la pile de papier (échantillons A1, B1).

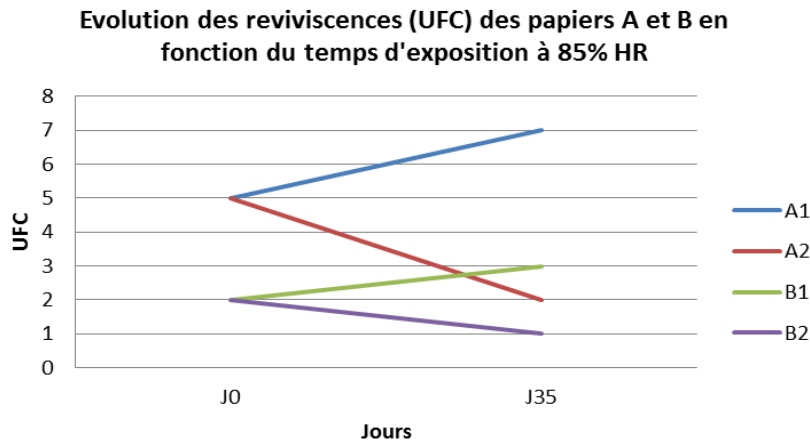


Fig.9 : Reviviscences des papiers A et B

La facilité d'accès de l'eau dans le papier semble donc avoir une influence sur la germination des espèces fongiques. Cependant la faiblesse des comptages et des échantillons conduit à rester prudent.

En ce qui concerne les échantillons 45 et 27, la fig.10 montre que deux profils de reviviscence sont identifiables :

- Profil 1 : les espèces fongiques ne sont pas affectées par l'expérience et leurs taux de reviviscence décroît avec le temps. C'est le cas de *Penicillium funiculosum* et *Aspergillus fumigatus*.
- Profil 2 : après une première période de forte augmentation de la reviviscence à J9, cette dernière s'effondre à J27. C'est le cas, par ordre croissant de *Penicillium brevicompactum*, *Absidia corymbifera*, *Monascus ruber* et *Aspergillus versicolor*.
- 

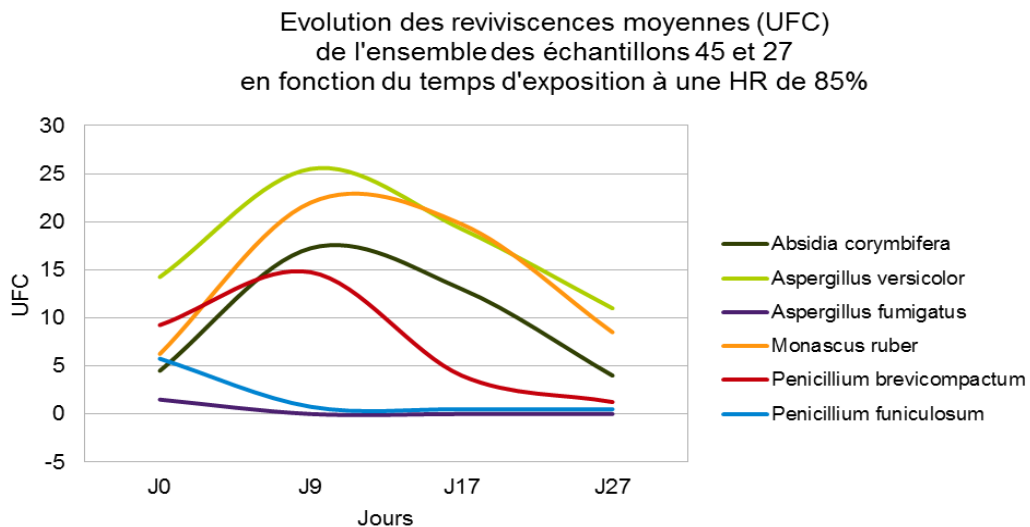


Fig.10 : Reviviscences des échantillons 27 et 45

Les histogrammes cumulés, fig.11, montrent quant à eux une autre tendance qui consiste en une meilleure conservation dans le temps de deux espèces : *Monascus ruber* et *Aspergillus versicolor*.

Histogrammes cumulés (%) de la flore fongique pour l'ensemble des échantillons 45 et 27 en fonction du temps d'expérience d'exposition à une HR de 85%

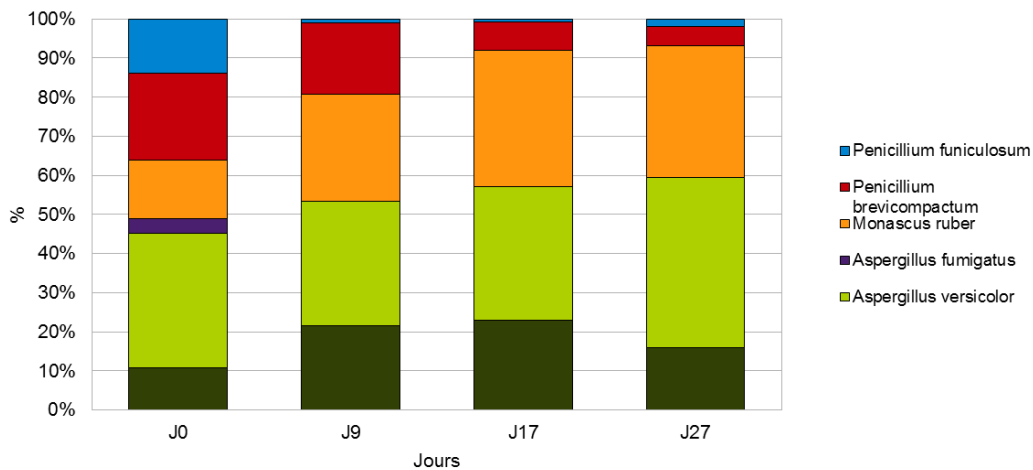


Fig.11 : Représentation de la flore des échantillons 27 et 45 en fonction du temps

On voit au travers de ces deux figures que 2 espèces seulement sur les 6 identifiées ont été favorisées lors de l'expérience d'humidification menée : *Aspergillus versicolor* et *Monascus ruber*. *Absidia corymbifera*. Elles ont également connu un pic de développement pour retomber ensuite à sa proportion d'origine. On peut donc considérer le bilan nul pour cette espèce. Les proportions relatives de *Penicillium* (tant *brevicompactum* que *funiculosum*) ont été divisées par quatre et *Aspergillus fumigatus* n'a été identifié dans les échantillons qu'avant expérience.

Or, les espèces isolées sont caractérisées, par un besoin minimal en eau libre dans les supports. Cette eau libre est nécessaire à leur germination et à leur croissance. Elle est, pour chaque espèce de :

- *Penicillium funiculosum* :  $A_w = 0,9$
- *Aspergillus fumigatus* :  $A_w = 0,85-0,94$
- *Absidia corymbifera* :  $A_w = 0,88$
- *Monascus ruber* :  $A_w = 0,85$
- *Penicillium brevicompactum* :  $A_w = 0,78$
- *Aspergillus versicolor* :  $A_w = 0,78$ .

On voit clairement ici s'établir un lien entre  $A_w$  minimale nécessaire à la croissance et taux de reviviscence observés : les espèces dont la conservation est favorisée par les conditions expérimentales sont : *Aspergillus versicolor*, *Monascus ruber* et (dans une moindre mesure) *Absidia corymbifera*.

A l'inverse, les espèces à fort besoin en contenu en eau libre sont clairement peu représentées après mise en culture. Il semble donc que 33 jours d'exposition dans un environnement fixé à 85% HR et 25°C, correspondant à une humidité au sein de la liasse test de plus de 80% sur une période de 10 jours (soit une teneur en eau des supports de 10,95) **ne soient pas suffisants pour provoquer une contamination fongique visuellement identifiable des papiers tests.**

Plusieurs facteurs peuvent expliquer le pic de reviviscence observé : l'entrée d'eau plus importante dans les papiers en début d'expérience, qu'ensuite. Mais aussi le protocole de récolte et de contamination des papiers tests. En effet, la récolte par inondation des boîtes de Pétri et le séchage des papiers vaporisés a pu entraîner un stress hydrique, l'accumulation de solutés osmoprotecteurs et une plus grande réponse à l'augmentation d'*HR* en début d'expérience.

De ce fait ; les temps de développement sont sans doute plus longs que ce que nous avons prévu. En effet, Cahagnier (1984) rapporte que la production de mycélium par *Aspergillus candidus* après 60 jours de culture est 4 fois moindre à  $A_w$  de 0,85 qu'à  $A_w$  de 0,96.

En outre, Abellena et al. (1999) ont montré que la production de mycélium est plus rapidement affectée par une diminution de l' $A_w$  que la germination.

Dans notre cas, les conditions créées semblent tout juste suffisantes à amener la germination d'*Aspergillus versicolor* malgré une  $A_w$  théorique de 0,8. En principe l' $A_w$  est, pratiquement, considérée égale à l'*HR* à l'équilibre ( $HR_{\text{éq}}$ ).

En outre plusieurs études ont montré que l' $A_w$  minimale nécessaire à la croissance fongique est influencée par la composition du milieu. Il se peut que les charges et encollages du papier augmentent les valeurs d' $A_w$  théoriques mentionnées.

De plus, les niveaux d'alerte à établir lors de mises en culture sont à définir. En effet, les niveaux relevés sur les milieux (jusque 24 *UFC/cm*<sup>2</sup>) n'ont jamais été mis en relation avec des développements visuellement identifiables. Il apparaît également qu'au sein de liasses, le principal facteur inconnu est le temps de développement des contaminants fongiques.

## Conclusion.

Les résultats de notre étude montrent qu'une forte humidité environnementale n'est pas un facteur suffisant pour provoquer le développement d'espèces fongiques visible à l'œil nu malgré une température maintenue à 25°C. Toutefois nous avons vérifié que ces espèces existent bien, puisque, mises en culture elles se sont développées avec une prédominance de certaines d'entre elles.

Dans nos conditions expérimentales l'eau dans le papier, même si la teneur est élevée, se trouve certainement à l'état de vapeur et surtout elle est liée aux fibres de cellulose. Pour que l'eau soit active vis-à-vis des microorganismes il faut qu'elle soit libre. Cette dernière remarque implique soit :

- que les conditions d'équilibre ne sont pas atteintes et qu'après 10 jours d'*HR* mesurée à 80% dans la ramette, le contenu en eau disponible des papiers est inférieure à 0.78 ;
- que l'approximation  $A_w = HR_{\text{éq}}$  est à revoir pour les papiers.

Par conséquent dans les cas de contamination de magasins, réserves, sites protégés, il faut que d'autres paramètres ou événements interviennent pour qu'il y ait un apport d'eau libre. Une brusque chute de température peut-être à l'origine d'un phénomène de condensation d'eau au niveau des fibres et alimenté les micro-organismes. Un apport d'eau libre extérieur peut-être occasionné par des infiltrations, des inondations, des fuites d'un conduit d'eau, une perte d'étanchéité des baies, une porosité des murs, des phénomènes de condensation, etc.....

Du point de vue de notre expérience sur site, il est vrai que dans la plupart des cas, l'apparition d'une contamination fongique a été liée :

- Un mauvais état sanitaire des bâtiments – manque d'étanchéité, d'isolation.
- Des dysfonctionnements des CTA ou un mauvais entretien des équipements

- Mauvaise conception du bâtiment.
- Des accidents extérieurs au bâtiment ou des conditions climatiques extrêmes.

## Bibliographie :

Abellena M. et al, "Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products", in: *Journal of Applied Microbiology*, n°87, 1999.

Blackburn C., "Food spoilage microorganisms", 2006.

Cahagnier B., "Contribution à l'étude de la sporulation, de la croissance mycélienne et de la biosynthèse de l'ergostérol chez les moisissures de grains au cours de la conservation", 1984.

Corry J.E.L., "Relationships of water activity to fungal growth, in: *Food & Beverage Mycology*, 1987.

Padfield T., "The interaction of watervapour with paper", 2006.

Padfield et al, "The climate controle of the Arnamagnum Archive", 2014.