

SUIVI DE LA FLORE MICROBIOLOGIQUE DES FONTAINES DE BIODÉGRADATION DES GRAISSES

Les fontaines de biodégradation des graisses se composent d'un bac contenant un tensioactifensemencé par un mélange de bactéries. Le suivi de la flore microbiologique de plusieurs fontaines pendant une année a permis d'évaluer les risques biologiques. La quantification des bactéries a montré une concentration moyenne de $3,4 \cdot 10^5$ UFC/mL. L'identification des micro-organismes a révélé la présence de moisissures et de nombreuses espèces bactériennes différentes de celles initialementensemencées dans les fontaines. Ces micro-organismes pourraient provenir de l'ambiance de travail ou du personnel. En fonction des dangers potentiels des germes identifiés et du type d'exposition lors de l'utilisation des fontaines, certaines mesures de prévention ont été recommandées.

Lors des opérations de dégraissage dans l'industrie, les professionnels peuvent être amenés à utiliser des technologies mettant en œuvre des micro-organismes, comme les fontaines de biodégradation des graisses.

Une fontaine de biodégradation se compose d'un bac contenant un fluide composé d'un tensioactif^aensemencé par un mélange de bactéries (cf. Figure 1 - étape 1). La cuve est en permanence oxygénée et maintenue à une température autour de 37°C (conditions optimales de développement des bactéries utilisées dans ces procédés). Lors de l'utilisation de la fontaine, le mélange bactéries-tensioactif est aspiré dans un tuyau aboutissant à une brosse (cf. Figure 1 - étape 2). Le tensioactif met en suspension les graisses lors du broyage de la pièce. Le mélange graisse-bactéries-tensioactif tombe ensuite dans la cuve (cf. Figure 1 - étape 3) où la graisse est dégradée progressivement par les

micro-organismes (cf. Figure 1 - étape 4). Lors de leur utilisation, ces fontaines sont régulièrement supplémentées en tensioactif (pour compléter le volume évaporé) et réensemencées toutes les 4 à 6 semaines.

ÉVALUATION DES RISQUES BIOLOGIQUES LIÉS AUX FONTAINES

Comme tout procédé, ces fontaines doivent faire l'objet d'une évaluation des risques encourus par les utilisateurs. Or, de nombreuses questions subsistent quant à l'évaluation des risques biologiques liés aux bactéries des fontaines [1].

^a Tensioactif : produit émulsionnant les hydrocarbures et facilitant ainsi leur dégradation.

- Fontaine de biodégradation
- Micro-organisme
- Contamination
- Risque biologique

► Christine DAVID,
INRS, département Expertise et conseil technique

► Delphine BOUCHER,
Jean-Baptiste LAFFAIRE, Pierre PEYRET,
UMR CNRS 6023, équipe « Génomique intégrée des interactions microbiennes », Clermont-Ferrand

► Philippe DUQUENNE,
INRS, département Métrologie des polluants

► Catherine BRUGNOT,
CRAM Auvergne, Service Prévention

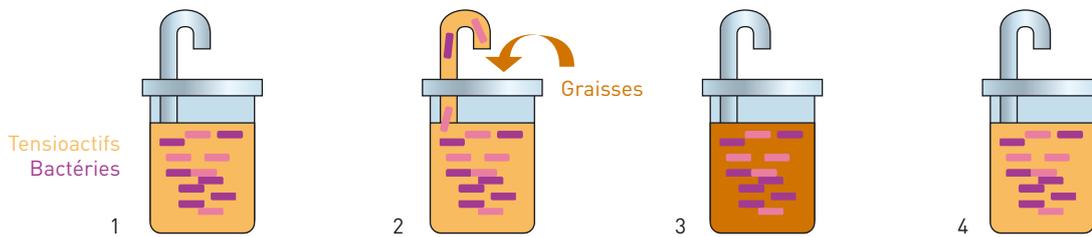
MONITORING MICROBIOLOGICAL FLORA IN FAT BIODEGRADATION FOUNTAINS

Fat biodegradation fountains comprise a tank containing a surface-active agent inoculated with a mixture of bacteria. Monitoring the microbiological flora of several fountains for one year allowed us to assess the biological risks. Bacteria quantification gave a concentration of $3.4 \cdot 10^5$ CFU/mL. Microorganism identification revealed the presence of moulds and numerous bacterial species different to those initially seeded in the fountains. These microorganisms could come from the working atmosphere or the personnel. A number of prevention measures have been recommended, based on the potential risks of the identified germs and the type of exposure when using the tanks.

- Biodegradation fountain
- Microorganism
- Contamination
- Biological risk

FIGURE 1

Différentes étapes de dégradation des graisses par les micro-organismes d'une fontaine



QUELLE EST LA CONCENTRATION DES MICRO-ORGANISMES DANS LES FONTAINES ?

Selon sa concentration et sa composition, une suspension bactérienne peut présenter un danger plus ou moins important. Or, la multiplication des bactéries dépend de l'apport nutritif. Ainsi, théoriquement, plus la fontaine fonctionne, plus il y a de graisse servant d'aliment aux micro-organismes et plus la flore prolifère.

QUELS SONT LES MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS DANS LES FONTAINES DE BIODÉGRADATION ?

Connaître les micro-organismes présents permet d'identifier les dangers potentiels. La plupart des micro-organismes sont inoffensifs voire bénéfiques pour l'homme. D'autres peuvent entraîner des infections, des intoxications ou des allergies. Or, certaines bactéries connues pour dégrader les graisses peuvent, chez des personnes immunodéprimées^b, dans des conditions d'exposition invasives, développer des infections. D'autres souches peuvent entraîner des intoxications alimentaires lorsqu'elles sont ingérées à de fortes concentrations [1]. D'autres encore peuvent libérer des toxines qui pourraient entraîner des affections respiratoires ou digestives.

LES MICRO-ORGANISMES DE L'ENVIRONNEMENT (AMBIANCE DE TRAVAIL, PERSONNEL, PIÈCES À DÉGRAISSER) PEUVENT-ILS CONTAMINER LES FONTAINES ?

Un milieu est colonisé par les micro-organismes les mieux adaptés. Théoriquement, une fois le milieu colo-

nisé par les millions de bactéries initialementensemencées dans la fontaine, un micro-organisme extérieur aura des difficultés à s'y développer. Pour cela, il faudra que ce germe soit mieux adapté que les souches déjà présentes ou que le milieu change.

Une étude de terrain a été entreprise afin de répondre à ces trois questions. Pendant une année, la flore microbienne a été suivie dans plusieurs fontaines placées dans des contextes industriels variés. Ce suivi comportait des mesures de concentration de la flore totale et des identifications des micro-organismes présents. La mise en évidence des micro-organismes environnementaux s'est faite en comparant les germes identifiés dans les fontaines et dans les mélanges servant à les ensemen-

Ainsi, sept fontaines de deux marques différentes ont été étudiées dans deux entreprises françaises : un garage de véhicules de transport en commun et des services de maintenance industrielle.

Toutes ces fontaines sont implantées dans des environnements variés : ateliers physiquement séparés les uns des autres, différents personnels, divers types de graisse et d'huile (cf. *Tableau 1*). De plus, ces fontaines sont utilisées plus ou moins intensivement (d'une fois par semaine à plusieurs fois par jour).

Le fluide de chaque fontaine a été prélevé en moyenne six fois au cours de l'année. Par ailleurs, le sédiment présent au fond des cuves a été prélevé, sur le même rythme, dans l'une des fontaines. Des prélèvements ont également été effectués sur les mélanges servant à ensemen-

Ces échantillons ont donné lieu à une quantification et une identification de la flore microbienne. La quantification des micro-organismes s'est faite par des techniques de dilution et d'ensemencement de milieux gélosés spécifiques des bactéries et des levures/moisissures. Les micro-organismes ont été identifiés par des techniques de biologie moléculaire (séquençage de fragments d'ADN codant pour l'ARNr 16S bactérien ou l'ARNr 18S fongique) à partir de colonies ayant poussé sur gélose ou directement à partir du fluide de la fontaine. L'identification effectuée à partir de colonies permet de nommer les bactéries vivantes, capables de se multiplier sur les milieux de cultures. Cette identification a été confirmée par des techniques biochimiques au moyen de l'automate Vitek 2C[®]. L'identification effectuée sans passer par l'étape de culture, mais directement à partir des fluides ou du sédiment de fontaines, permet de nommer les bactéries vivantes et mortes. Toutefois, étant donné les paramètres variables inhérents aux techniques de biologie moléculaire (efficacité de l'extraction d'ADN, efficacité de la réaction PCR^c, nombre de copies de gènes 16S), le nombre de séquences identifiées ne correspond pas exactement au nombre de bactéries présentes dans le fluide.

^b Personne immunodéprimée : personne aux défenses immunitaires affaiblies.

^c PCR : Polymerase chain reaction, technique de biologie moléculaire permettant l'amplification de séquences d'ADN ou d'ARN.

TABLEAU I

Différents usages des fontaines suivies lors de l'étude

FONTAINES	FRÉQUENCES D'UTILISATION	GRAISSES ET HUILES UTILISÉES
F1	Plusieurs fois/semaine	Huile hydraulique, huile moteur, huile de boîte, graisse de silicone, graisse multifonction, graisse haute température
F2	Plusieurs fois/semaine à plusieurs fois/jour	Graisse multifonction
F3A (fontaine arrêtée en cours d'étude)	Plusieurs fois/semaine à plusieurs fois/jour	Huile hydraulique et kerdane
F3B (autre marque de fontaine ayant pris la suite de la fontaine F3A)	Plusieurs fois/semaine à plusieurs fois/jour	Huile hydraulique et kerdane
F4	Une fois/semaine à plusieurs fois/semaine	Graisse haute température et graisse multifonction, antirouille pâteux
F5	Plusieurs fois/semaine à plusieurs fois/jour	Grande variété de graisses et d'huiles
F6	Plusieurs fois/semaine à plusieurs fois/jour	Graisses et huiles utilisées en mécanique poids lourds

QUELLE EST LA CONCENTRATION DES MICRO-ORGANISMES DANS LES FONTAINES ?

DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN

Les concentrations bactériennes des fluides de toutes les fontaines ont fluctué sur une année entre $1,2 \cdot 10^3$ et $3 \cdot 10^6$ UFC^d/mL (cf. Figures 2 et 2 bis).

L'observation de la fontaine F1 a permis de constater une baisse de la concentration bactérienne, qui est passée de $1,3 \cdot 10^6$ UFC/mL en février à $3,2 \cdot 10^3$ UFC/mL en juin (cf. Figure 2, courbe F1). Cette baisse est concomitante avec une diminution de l'utilisation de la fontaine liée à la fermeture de l'atelier. La flore de la fontaine F1 a été quantifiée aussi bien dans le fluide que dans le sédiment présent au fond de la cuve. La population bactérienne du sédiment a évolué globalement comme celle du fluide (cf. Figure 2, courbe F1S). Toutefois, le nombre de bactéries sédimentaires s'est stabilisé après le mois d'avril à un niveau supérieur à celui du fluide ($1,2 \cdot 10^5$ UFC/mL de sédiment). Ceci peut s'expliquer si la fontaine, peu

utilisée, a été éteinte régulièrement, supprimant alors le brassage permettant la mise en suspension des bactéries dans le fluide.

La population bactérienne de la fontaine F2 varie entre $6 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^5$ UFC/mL (cf. Figure 2, courbe F2). Ce niveau relativement stable au cours du temps est à mettre en parallèle avec un usage régulier de la fontaine et donc un apport régulier d'aliments aux micro-organismes.

Les fontaines F5 et F6, utilisées sur le même rythme que la fontaine F2, présentent des concentrations moyennes en bactéries de respectivement $5,6 \cdot 10^5$ UFC/mL et $7,7 \cdot 10^5$ UFC/mL (cf. Figure 2, courbe F5 et Figure 2 bis). Dans les deux cas, une chute de la flore bactérienne totale a été observée. La diminution des bactéries dans la fontaine F6 s'est traduite par une saturation du fluide en graisse et une nette perte d'efficacité de dégraissage des pièces mécaniques. Pour remédier à ces réductions de flore, la fontaine F5 a été réensemencée et la fontaine F6 a fait l'objet d'une vidange complète puis d'un remplissage par un nouveau tensioactif réensemencé. Dans les deux cas, les prélèvements suivant ces opérations ont permis de constater une augmentation de la flore totale.

Au cours de l'étude, une fontaine (F3A) d'un atelier a été remplacée par une fontaine d'une autre marque (F3B). Cela a permis de comparer la flore de deux marques dans un environnement similaire : mêmes personnel, type d'huile, rythme d'utilisation et ambiance de travail. Les populations bactériennes atteignent en moyenne $2,4 \cdot 10^5$ UFC/mL pour la fontaine F3A et $4,5 \cdot 10^5$ UFC/mL pour la fontaine F3B (cf. Figure 2, courbes F3A et F3B). Utilisées dans des conditions similaires, la flore des fontaines de marques différentes se développe sensiblement de la même façon.

La fontaine F4 partiellement utilisée (parfois une seule fois par semaine) montre un nombre de bactéries plus faible comparé aux fontaines précédentes (cf. Figure 2, courbe F4). Ce nombre fluctue entre $1,2 \cdot 10^3$ UFC/mL et $3,6 \cdot 10^4$ UFC/mL.

DÉNOMBREMENT FONGIQUE

La recherche systématique de tous les micro-organismes des fontaines a permis de mettre en évidence la présence de champignons microscopiques (levures/moisissures). Toutefois, les concentrations de ces champignons sont généralement inférieures ou égales à 320 UFC/mL (cf. Figure 3).

Les levures/moisissures sont même absentes, ou du moins inférieures au niveau de détection, dans 31 % des prélèvements. Ainsi, la fontaine F5, dans laquelle étaient dénombrés en moyenne 25 UFC de champignons/mL en février et mars, ne présentait plus aucun de ces micro-organismes dans les mois qui suivirent. De même, aucun champignon vivant n'a été détecté dans les prélèvements effectués sur la fontaine F3B. Cette fontaine succédait, dans le même atelier, à la fontaine F3A, dans laquelle des champignons avaient été mis en évidence (en moyenne 170 UFC/mL). Dans un même environnement, les fontaines de marques différentes semblent plus ou moins susceptibles d'être contaminées par des champignons.

Des pics de contamination fongique supérieurs à 320 UFC/mL ont été observés dans 4 échantillons sur 41. Ainsi, il a été trouvé en juin, jusqu'à 1100 UFC/mL dans le sédiment de la fontaine F1

^d UFC : unité formant colonie.

FIGURE 2

Fluctuations des populations bactériennes des différentes fontaines au cours de l'année 2007

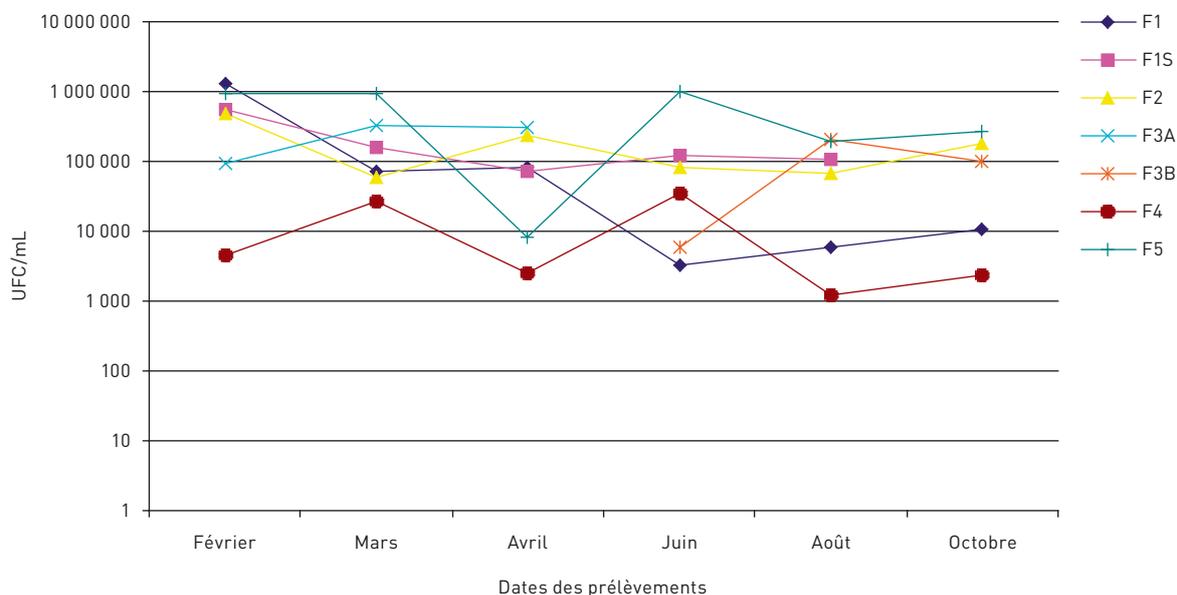
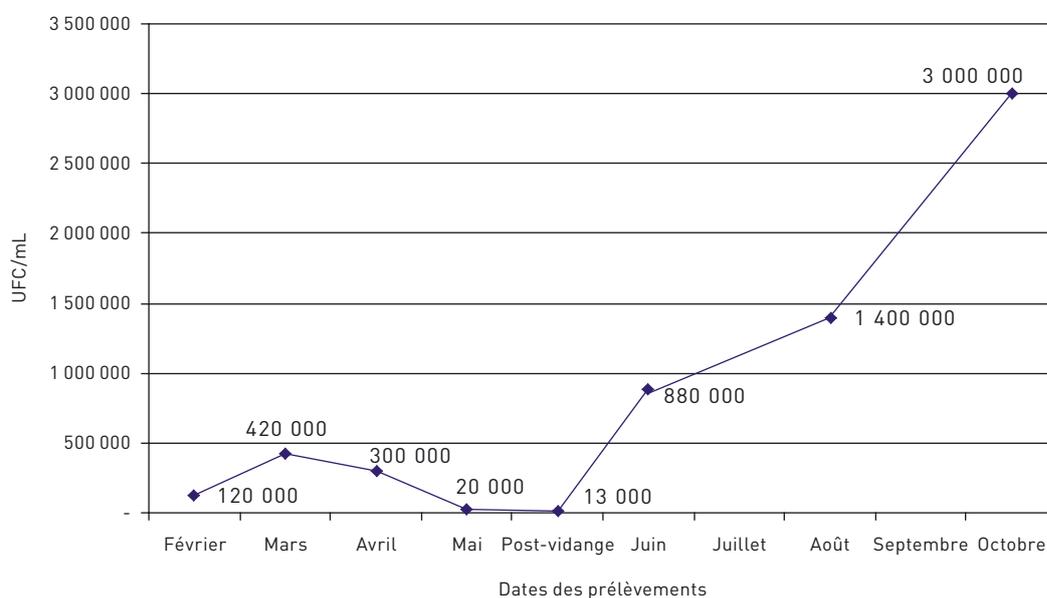


FIGURE 2 bis

Fluctuations des populations bactériennes de la fontaine F6 au cours de l'année 2007



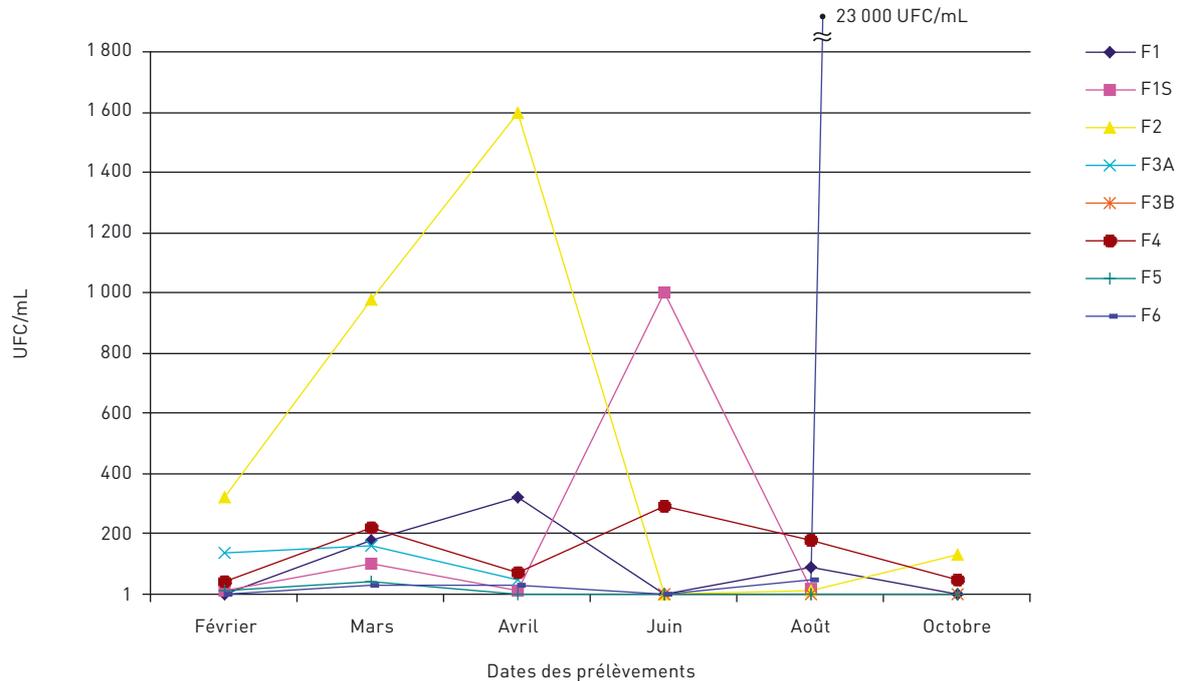
(cf. Figure 3, courbe F1S), au moment où aucun champignon n'était quantifié dans le fluide (cf. Figure 3, courbe F1), qui atteignait au mieux 320 UFC/mL au mois d'avril. De même, la population des fontaines F2 et F6 a pu atteindre respectivement 1 600 UFC/mL et 23 000 UFC/mL.

Cette fontaine F6 a fait l'objet d'une vidange au mois de mai : changement de tensioactif et réensemencement. Or, on constate que les champignons mis en évidence avant la vidange ont rapidement recolonisé cette fontaine (cf. Figure 3, courbe F6). Une vidange ne suffit pas à éliminer complètement les contaminants. Pour minimiser la reco-

lonisation des champignons, il conviendrait de nettoyer puis désinfecter la cuve (à l'aide d'un produit fongicide et non bactéricide) avant l'introduction d'un nouveau fluide.

FIGURE 3

Fluctuations des populations fongiques des différentes fontaines au cours de l'année 2007



QUELS SONT LES MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS DANS LES FONTAINES ?

LA FLORE FONGIQUE

L'identification des champignons a été réalisée par typage moléculaire, à partir de souches isolées des fontaines F1, F1S, F2 et F6, situées dans des ateliers et des entreprises différentes. Toutes ces souches ont été identifiées comme appartenant à l'espèce de levure *Candida parapsilosis*.

LA FLORE BACTÉRIENNE

L'identification effectuée à partir de colonies poussant sur gélose a permis d'identifier 16 genres bactériens, dont 10 (*Providencia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Stenotrophomonas*, *Citrobacter*, *Moellerella*, *Ochrobactrum*) représentent chacun plus de 1 % des colonies isolées des fontaines (cf. @nnexe).

En poussant l'identification plus loin, 31 espèces ont pu être mises en évidence, dont les plus fréquentes sont : *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneu-*

moniae, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis/Bacillus amyloliquefaciens*^e et *Enterobacter radicincitans* (cf. @nnexe). Cependant, ces espèces ne sont pas toujours présentes dans toutes les fontaines. Par exemple, *Achromobacter xylosoxidans* est majoritairement représentée dans une des fontaines, alors qu'elle est minoritaire dans 3 fontaines et non-trouvée dans 3 autres.

Le séquençage des micro-organismes extraits directement du fluide ou du sédiment a permis d'identifier d'autres genres et espèces bactériens. Le calcul de l'indice Abundance-based coverage estimator (ACE) [2] a fourni ensuite la proportion de bactéries identifiées par rapport à la population totale estimée présente dans les fontaines. L'ACE indique que le séquençage direct a permis d'identifier au moins 71 % de la diversité bactérienne dans 79 % des prélèvements, au moins 90 % de la diversité dans près d'un tiers des échantillons et jusqu'à 100 % de la diversité dans 6 échantillons.

Trente genres ont été identifiés par séquençage direct, dont 12 (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Ochrobactrum*, *Bordetella*, *Stenotrophomonas*, *Alkalibacterium*)

sont représentés à plus de 2 % dans les fontaines (cf. @nnexe). Ces derniers sont également retrouvés après culture sur gélose, à l'exception des *Ralstonia*, *Bordetella* et *Alkalibacterium*. Inversement, les *Bacillus* identifiés après culture dans 6 fontaines sur 7, ne représentent que 0,08 % des genres identifiés après séquençage direct. Les *Moellerella*, représentant 1 % des colonies identifiées, ne sont plus retrouvées par les techniques de séquençage direct. Ceci reflète les limites et les biais des techniques (les milieux de cultures favorisant la croissance de certaines bactéries au détriment d'autres) et la nécessité d'utiliser plusieurs techniques pour être le plus représentatif possible.

L'identification des espèces d'après les séquences d'ADN extraites des fluides, fait apparaître 46 espèces, dont les plus représentées sont : *Klebsiella pneumoniae/K. variicola*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Citrobacter farmeri/C. amalonaticus*, *Citrobacter freundii/C. murlinae*, *Providencia stuartii* (cf. @nnexe). L'espèce *A. xylosoxidans* et les genres *Citrobacter* et *Pseudomonas* sont retrouvés dans toutes les fontaines,

^e Les deux espèces n'ont pas pu être différenciées en raison des fortes homologies de séquences d'ADN.

FIGURE 4

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le fluide de la fontaine F1

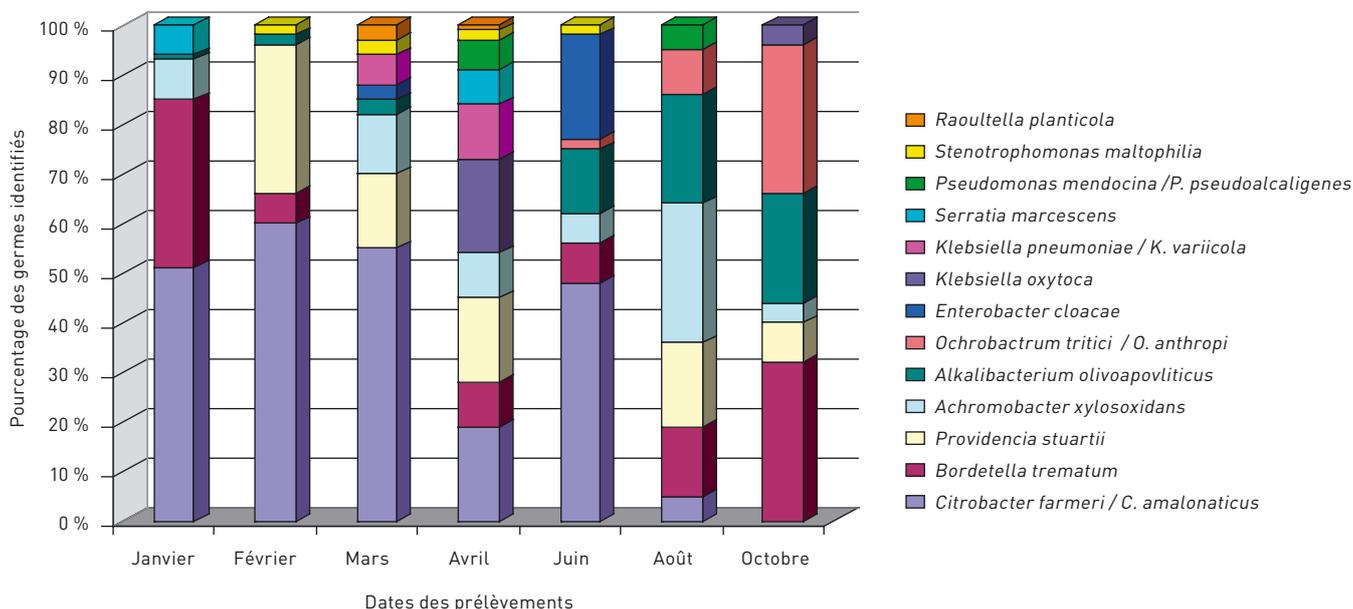


TABLEAU II

Indices de similarité Morisita-Horn déterminés pour la fontaine F1

F1	Janvier	Février	Mars	Avril	Juin	Août	Octobre
Janvier	100 %						
Février	78 %	100 %					
Mars	79 %	94 %	100 %				
Avril	53 %	57 %	61 %	100 %			
Juin	81 %	78 %	87 %	46 %	100 %		
Août	35 %	30 %	36 %	49 %	34 %	100 %	
Octobre	36 %	14 %	8 %	28 %	23 %	66 %	100 %

quels que soient leur marque, les graisses qu'elles dégradent et leur environnement. Mis à part ces bactéries communes, les populations bactériennes fluctuent énormément d'une fontaine à l'autre et au sein même d'une fontaine.

DYNAMIQUE DES POPULATIONS BACTÉRIENNES

La représentation graphique des espèces présentes dans le fluide d'une fontaine au cours du temps met en évidence une grande diversité (cf. Figures 4, 6, 7 et @annexe) :

la proportion d'une espèce peut énormément varier dans le temps (sachant que le nombre de séquences

identifiées n'est pas exactement corrélé avec le nombre de bactéries présentes dans le fluide) ;

une espèce peut apparaître et disparaître après un temps plus ou moins court ; par exemple, *C. freundii*/*C. murliniae* apparaît dans la fontaine F3A en février et disparaît le mois suivant, ou tout au moins se situer en dessous du niveau de détection (cf. Figure 6) ;

le nombre total d'espèces peut varier d'un mois à l'autre (la fontaine F2 passe de 4 espèces en avril à 11 espèces en juin, cas extrême de la fontaine F3B qui passe d'une espèce en juillet à 8 espèces en août).

Les fontaines étudiées contiennent en moyenne 7 espèces bactériennes différentes au moment des prélèvements

(si l'on excepte l'unique prélèvement de la fontaine F3B ne révélant qu'une seule espèce). Il a été identifié au maximum 12 espèces dans un même prélèvement (la fontaine F2 en août et en octobre).

ÉQUILIBRE PRÉCAIRE DES POPULATIONS D'UNE FONTAINE

La variation des populations bactériennes peut être quantifiée par l'indice de similarité de Morisita-Horn, calculé à l'aide du logiciel Estimate S. Cet indice permet de comparer le degré de similitude entre les différents échantillons d'une fontaine [2]. Ainsi, malgré les populations apparemment fluctuantes de la fontaine F1, l'indice de Morisita-Horn indique que les prélèvements de

FIGURE 5

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le sédiment de la fontaine F1

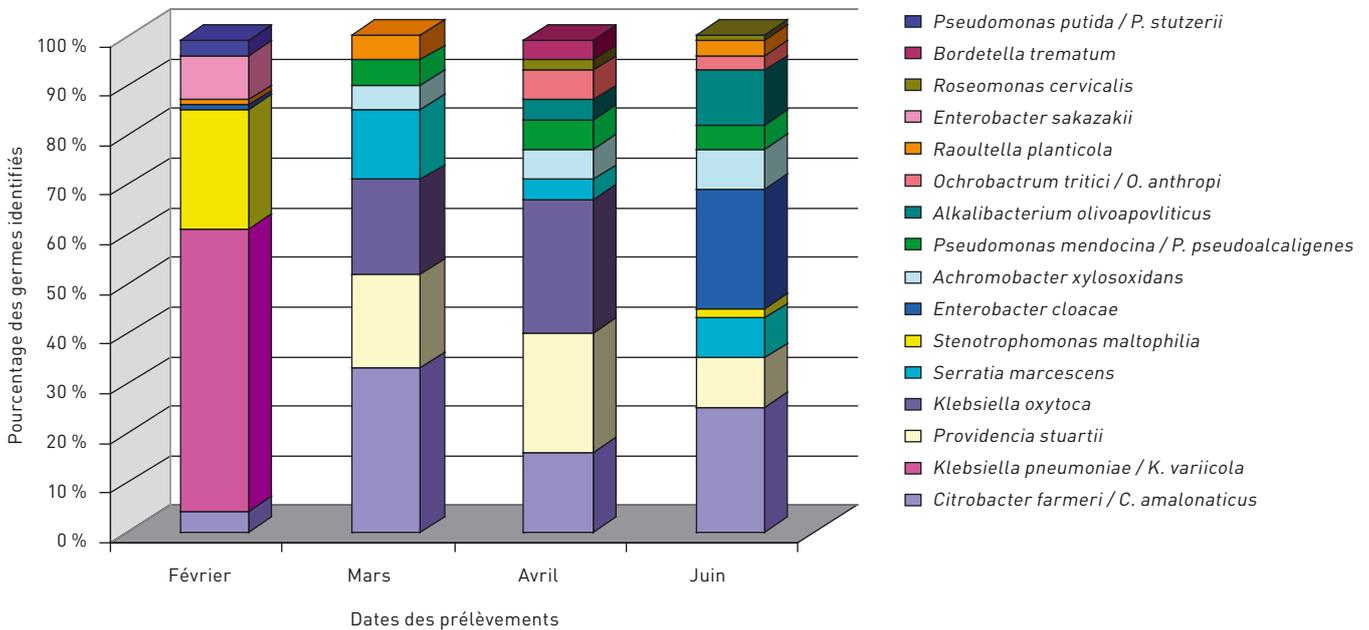


TABLEAU III

Indices de similarité Morisita-Horn déterminés pour le fluide (F1) et le sédiment (F1S) de la fontaine F1

F1 \ F1S	Février	Mars	Avril	Juin
Janvier	6 %	61 %	38 %	52 %
Février	8 %	77 %	56 %	60 %
Mars	18 %	79 %	52 %	70 %
Avril	29 %	85 %	88 %	54 %
Juin	8 %	63 %	39 %	83 %
août	1 %	33 %	50 %	47 %
Octobre	0 %	11 %	35 %	22 %

janvier, février, mars et juin présentent une similarité d'au moins 78 % (cf. *Tableau II*). La flore présente dans le sédiment de cette fontaine a été analysée de la même façon que le fluide (cf. *Figures 4 et 5*). Ce sédiment comprend de nombreuses populations bactériennes, qui fluctuent tout autant que celles des fluides. L'indice de Morisita-Horn témoigne d'une bonne similitude entre la flore du fluide prélevé de janvier à juin et celle du sédiment prélevé de mars à juin (cf. *Tableau III*). Cependant, trois espèces sédimentaires ne sont pas identifiées dans le fluide. Parmi elles, une espèce présente dans le mélange servant à ensemercer la fontaine. Cette

espèce n'a pas trouvé dans le fluide les conditions idéales de développement et a donc sédimenté au fond de la fontaine. Étant donné que ces séquences ont été identifiées au moyen de techniques de biologie moléculaire, il peut s'agir de bactéries qui se développent préférentiellement dans le sédiment ou de bactéries mortes ayant sédimentées.

De fortes similarités sont également observées dans la fontaine F5, entre les prélèvements de février/mars/juin (au moins 88 % de similarité, prédominance de *Klebsiella pneumoniae/K variicola*) et entre les prélèvements d'avril/août/octobre (au moins 83 % de simi-

larité, prédominance d'*Achromobacter xylosoxidans*) (cf. @nnexe). En comparant ces observations à la courbe de croissance de la flore totale de la fontaine F5, l'on constate que les populations de février/mars/juin sont observées lorsque la flore est à son maximum autour de 10^6 UFC/mL, mais que ces populations changent lors des baisses de la flore bactérienne.

De la même façon, les populations de février/mars/avril/octobre de la fontaine F6 sont similaires à plus de 90 %. Or, cette fontaine a vu sa flore fortement chuter en mai, puis a été vidangée et ensemençée. On observe que la flore a varié au moment de la chute (18 % de similarité avec la flore de février) et que sa composition s'est rapprochée progressivement de la composition initiale, pour atteindre en octobre 90 % de similitude avec la flore de février (cf. @nnexe).

Les populations bactériennes d'une fontaine sont en constant équilibre les unes par rapport aux autres. Cet équilibre peut être facilement rompu à la moindre modification du milieu, entraînant la mort de certaines populations bactériennes, donc une baisse globale et un changement de composition de la flore. Les bactéries mieux adaptées à ce nouveau milieu prennent le dessus sur les bactéries précédemment majoritaires.

COMPARAISON DES POPULATIONS DE DIFFÉRENTES FONTAINES

Malgré les fluctuations des populations bactériennes au sein d'une fontaine, les mêmes espèces majoritaires sont retrouvées dans les fontaines de même marque. Ainsi, 97 % des

séquences identifiées dans les fontaines d'une marque appartiennent aux genres *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Ochrobactrum*, *Bordetella*, *Stenotrophomonas* et *Alkalibacterium*, alors que 93 % des séquences identifiées dans la fontaine d'une autre marque

appartiennent au genres *Ralstonia* et *Pseudomonas*.

Plus précisément, les espèces identifiées dans 60 % des cas dans les fontaines de la première marque sont *Klebsiella pneumoniae*/*K. variicola*, *Achromobacter xylosoxidans*,

FIGURE 6

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le fluide de la fontaine F3 A

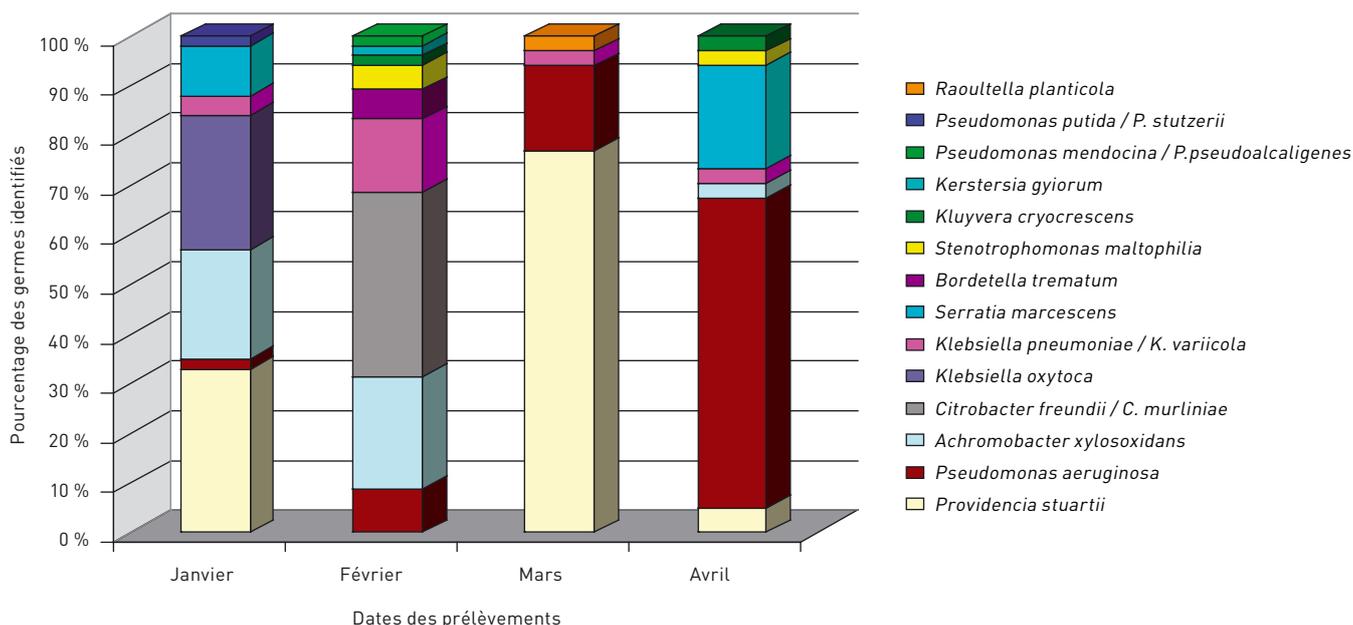
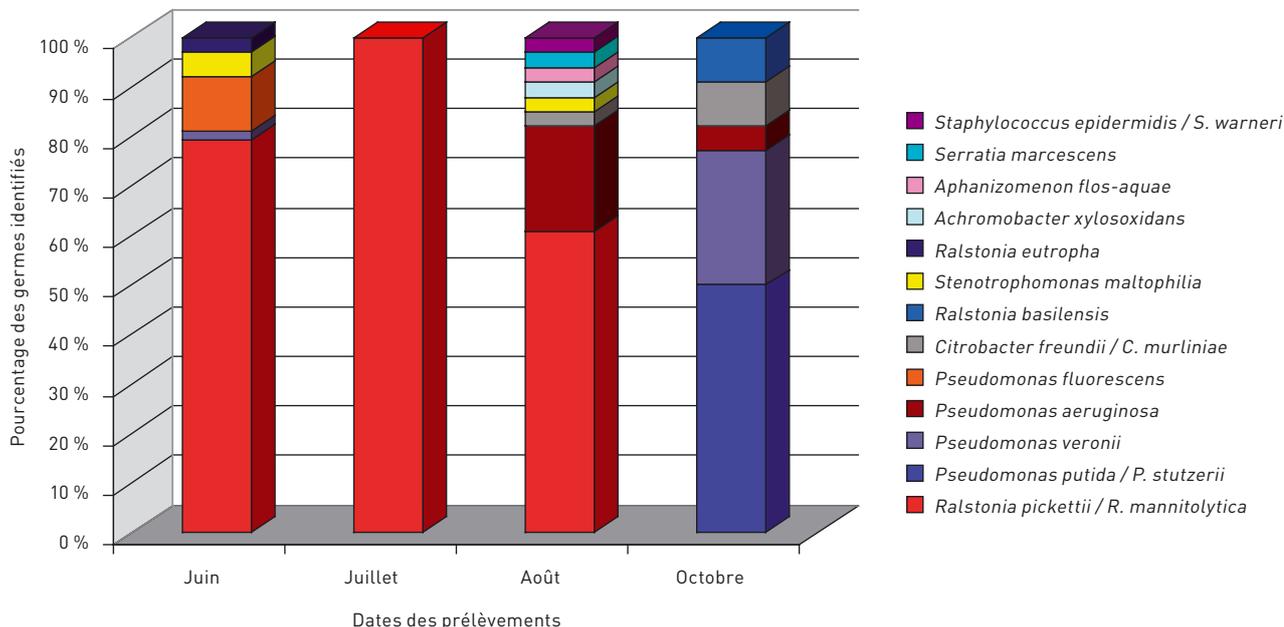


FIGURE 7

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le fluide de la fontaine F3 B



Citrobacter freundii/C. *murlinae*, *Citrobacter farmeri*/C. *amalonaticus* et *Providencia stuartii*. Dans la fontaine de l'autre marque, *Ralstonia pickettii*/R. *mannitolytica* et *Pseudomonas putida*/P. *stutzerii* représentent 74 % des espèces identifiées.

L'indice de Morisita-Horn montre que les fontaines de même marque offrent des similitudes globalement bonnes, surtout entre les populations des fontaines F4, F5 et F6. Il s'agit pourtant de fontaines placées dans des ateliers et des entreprises différents, fournissant donc des environnements différents. Par contre, les fontaines de marques différentes (F3A et F3B), placées dans un environnement identique, ne présentent pratiquement aucune similitude (cf. *Figures 6 et 7*).

Cette différence de populations microbiennes d'une marque à l'autre pourrait s'expliquer par la formulation des tensioactifs et la composition du mélange bactérien servant à l'ensemencement. Aussi, les espèces bactériennes identifiées dans les fontaines de chaque marque ont été comparées aux espèces présentes dans les mélanges bactériens.

La principale bactérie, identifiée dans 54 % des séquences extraites du mélange de la première marque, est retrouvée dans deux tiers des fontaines. Toutefois, elle n'est retrouvée, sur la durée de l'étude, que dans un prélèvement par fontaine, où elle ne représente au mieux que 3 % des séquences identifiées. Cette bactérie n'est identifiée que dans les prélèvements suivant une opération de ré-ensemencement, mais pas de façon systématique. Elle a été retrouvée majoritaire dans un seul prélèvement, effectué au moment de la vidange de la fontaine F6. Les opérateurs ont ré-ensemencé la fontaine juste avant de la vidanger, puis ont ensemencé le nouveau tensioactif. L'analyse du prélèvement effectué avant la vidange a mis en évidence cette bactérie dans 62 % des séquences identifiées. Dans les prélèvements suivants, cette bactérie n'était plus présente qu'à 2 %, puis disparaissait 2 à 3 mois plus tard. Juste après la vidange et l'ensemencement du nouveau fluide, une autre espèce bactérienne est apparue massivement dans la fontaine (96 % des séquences identifiées), alors qu'elle était absente du mélange commercial. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de cette

espèce dans le tensioactif introduit dans la fontaine.

Une seconde bactérie identifiée dans 20 % des séquences extraites du mélange a été retrouvée dans toutes les fontaines, dans des proportions comprises entre 2 et 24 %. Les autres bactéries du mélange ont été peu ou pas identifiées dans les fontaines.

Concernant la seconde marque, une seule des bactéries du mélange a été retrouvée dans la fontaine, mais 5 mois après l'ensemencement initial.

Les bactéries des mélanges commerciaux sont peu retrouvées dans les fontaines en usage. Malgré cela et malgré des environnements différents, des similitudes de populations bactériennes sont observées entre fontaines de même marque. Ces ressemblances pourraient s'expliquer par la composition du tensioactif présent dans les fontaines de même marque.

LES MICRO-ORGANISMES DE L'ENVIRONNEMENT PEUVENT-ILS CONTAMINER LES FONTAINES ?

L'analyse des micro-organismes présents dans les fontaines montre clairement que des levures et de nombreuses bactéries non délibérément ensemencées peuvent coloniser les fluides.

Les micro-organismes se trouvent naturellement dans les endroits réunissant les conditions favorables à leur développement, notamment les produits dont ils se nourrissent. Il est donc normal de retrouver dans un atelier, où sont présents des graisses et des huiles, des bactéries qui se nourrissent de ces matières premières. Certaines espèces bactériennes sont connues depuis des années pour leur capacité naturelle à dégrader les graisses, les huiles ou encore synthétiser des tensioactifs. Les souches les plus étudiées pour leur capacité à produire des tensioactifs et à dégrader les hydrocarbures sont notamment *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas fluorescens* [3]. Des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Serratia marcescens* ont également été

identifiées comme pouvant synthétiser des tensioactifs [4, 5]. Cette étude a mis en évidence ces espèces bactériennes, ainsi que d'autres, dans les fontaines de biodégradation des graisses. Reste à déterminer l'origine (atelier, personnel) et les dangers potentiels de ces micro-organismes.

Les *Klebsiella*, principal genre identifié dans les fontaines, sont retrouvées naturellement dans le sol et l'eau, sur les végétaux, mais également dans les selles, sur la peau, les muqueuses et les voies respiratoires [6]. Les bactéries de ce genre sont classées dans le groupe 2 des agents biologiques infectieux (article R. 4421-3 du code du travail). Toutefois, il s'agit de bactéries opportunistes, qui profitent d'une baisse des défenses immunitaires de l'hôte pour éventuellement entraîner des infections.

Les espèces du genre *Citrobacter* sont des hôtes normaux du tube digestif et sont isolées des selles d'humains et d'animaux [7]. Ces bactéries sont retrouvées dans le sol et l'eau au même titre que les *Achromobacter* identifiés dans les fontaines de biodégradation [7].

Les *Pseudomonas*, sont très répandues et se trouvent dans l'eau (douce ou salée), le sol, les végétaux et le tube digestif humain et animal [7]. Une des espèces identifiée dans les fontaines, *Pseudomonas aeruginosa*, est classée dans le groupe 2 des agents biologiques infectieux. Il s'agit d'une espèce opportuniste qui peut, lors de la baisse des défenses immunitaires, entraîner des infections notamment cutanées [6].

Les *Providencia* sont naturellement hébergées dans le tube digestif de l'homme et des animaux et se retrouvent dans le sol et l'eau. Les espèces de ce genre sont classées dans le groupe 2 des agents biologiques infectieux. Elles peuvent être responsables d'infections des voies urinaires et des plaies, mais comme elles sont très fréquentes dans l'environnement, il y a lieu de vérifier la qualité du prélèvement avant de leur attribuer un rôle pathogène [6].

Les *Enterobacter* font partie de la flore naturelle du tube digestif de l'homme et des animaux. Ces bactéries sont également retrouvées sur la peau et les muqueuses, ainsi que dans le sol et l'eau [6]. Les espèces de ce genre sont classées dans le groupe 2 des agents biologiques infectieux. Il s'agit de bactéries

opportunistes pouvant éventuellement entraîner des infections lors de la baisse des défenses immunitaires.

Bacillus thuringiensis/*B. cereus*, *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* et *B. pumilus* ont été retrouvées dans les fontaines de biodégradation. Ces bactéries vivent principalement dans le sol, mais également dans l'eau (douce ou salée) [6]. Il s'agit de bactéries opportunistes, pouvant parfois être isolées de plaies infectées (*B. cereus*, *B. thuringiensis*) et entraîner des toxi-infections alimentaires lorsqu'elles sont ingérées à plus de 10^7 germes par mL (*B. cereus* et parfois *B. subtilis* et *B. pumilus*) [7]. Rappelons que la concentration bactérienne totale des fontaines de cette étude s'est élevée au maximum à 3.10^6 UFC/mL.

Les *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum* et les *Serratia* sont présentes dans le sol, l'eau et sur les végétaux [7].

La levure *Candida parapsilosis* identifiée dans les fontaines se trouve naturellement sur la peau des hommes, mais peut parfois provoquer des infections de la peau ou des ongles.

Les micro-organismes colonisant les fontaines peuvent provenir de l'atelier (où elles se nourrissent déjà des graisses et huiles présentes), mais également du personnel. En travaillant mains nues, les opérateurs apportent dans les fontaines les micro-organismes naturellement présents sur leur peau ou ceux qui s'y sont déposés après contact avec des réservoirs d'agents biologiques (terre, mur, selles...).

CONCLUSION

Le suivi quantitatif de la flore microbienne des 6 fontaines a montré une prolifération bactérienne et fongique moyenne de respectivement $3.4.10^5$ UFC/mL et de 140 UFC/mL. La concentration de la flore totale d'une fontaine varie suivant l'usage qu'il en est fait : elle reste stable lorsque la fontaine fonctionne régulièrement, mais chute rapidement lorsque la fontaine est moins employée.

De nombreux genres bactériens ont été identifiés, tels que *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*,

Providencia, *Enterobacter* et *Bacillus*, ainsi que la levure *Candida parapsilosis*.

Les genres bactériens identifiés dans les fontaines étudiées sont différents de ceux caractérisés dans les mélanges servant à ensemercer les fontaines. Les bactéries de l'environnement (atelier et personnel) seraient donc capables de coloniser rapidement les fontaines et de supplanter la flore bactérienne initialement ensemençée. Certains micro-organismes (*Pseudomonas*, *Bacillus*...), habituellement présents dans la nature et connues pour dégrader les graisses et les huiles, pourraient provenir de l'atelier. Les micro-organismes des fontaines pourraient également être d'origine humaine, comme par exemple *Candida parapsilosis* normalement présent sur la peau ou les *Enterobacter* trouvés naturellement dans les selles. À noter que la plupart de ces micro-organismes sont également identifiés dans les fluides de coupe aqueux, liquides à base d'huile servant de lubrifiant lors de l'usinage des métaux [8].

Cette étude a mis en évidence de sensibles différences de communautés bactériennes entre des fontaines de deux marques différentes placées dans un même environnement (personnels, produits à dégraisser, rythme d'utilisation et atelier identiques). De façon complémentaire, des fontaines de même marque, placées dans des environnements différents, révèlent un certain degré de similitude entre communautés bactériennes. Les genres de micro-organismes colonisant les fontaines ne dépendraient donc pas uniquement de l'environnement, mais aussi de la composition chimique du tensioactif de la fontaine.

Les populations bactériennes varient énormément au sein d'une fontaine :

■ les espèces ne sont pas toujours les mêmes, elles peuvent apparaître et disparaître rapidement (du moins se situer sous le niveau de détection des techniques employées),

■ la proportion d'une espèce donnée peut fluctuer dans le temps.

■ le nombre total d'espèces présentes simultanément oscille autour d'une moyenne de 7 espèces.

Ces évolutions de populations s'observent aux moindres modifications du milieu, comme :

■ un changement de la nature des graisses,

■ une augmentation ou une baisse de l'apport en graisse ou en tensioactif,

■ une modification de la température et de l'oxygénation lors de l'arrêt des fontaines,

■ un ré-ensemencement de la fontaine.

Sans moyen technique lourd, il est impossible de définir à tout moment la composition précise de la flore microbienne des fontaines et, donc, le danger qu'elle représente. Toutefois, d'après cette étude menée sur une année, les fontaines contiennent principalement des micro-organismes non pathogènes, mais d'autres pourraient entraîner des pathologies lors des baisses des défenses immunitaires des personnes.

Lors de l'utilisation des fontaines, le personnel peut être exposé par contact cutané, projection de fluide ou encore par ingestion en portant les mains à la bouche.

En fonction des pathologies liées aux germes potentiellement présents et des modes d'exposition possibles, le personnel risque principalement des infections de plaies. Les risques liés à l'exposition aux aérosols générés lors de l'utilisation des fontaines ne peuvent être exprimés de façon précise, dans la mesure où des prélèvements d'air n'ont pas pu être effectués dans le cadre de cette étude.

Les mesures de prévention des risques liés aux fontaines consistent à porter des vêtements de travail protégeant la peau, porter des gants, protéger les plaies et porter des lunettes de protection. À cela s'ajoute le respect des mesures d'hygiène, comme se laver les mains après avoir ôté ses gants et avant de porter ses mains à la bouche ou avant qu'elles ne touchent des objets portés à la bouche (crayons, nourriture, boisson, cigarettes...), ainsi qu'avant et après le passage aux toilettes.

Reçu le : 01/10/2008

Accepté le : 13/11/2008

POINTS À RETENIR

- Le suivi quantitatif de la flore a montré une prolifération bactérienne et fongique moyenne de respectivement $3,4 \cdot 10^5$ UFC/mL et de 140 UFC/mL.
- Les nombreux genres bactériens identifiés sont différents de ceux caractérisés dans les mélanges servant à ensemercer les fontaines.
- Ces micro-organismes pourraient provenir de l'ambiance de travail ou du personnel.
- Il est impossible de définir à tout moment la composition précise de la flore microbienne des fontaines, les populations bactériennes variant énormément à la moindre modification du milieu.
- En fonction des dangers potentiels et du type d'exposition, certaines mesures de prévention sont recommandées : porter des vêtements de travail protégeant la peau, porter des gants, protéger les plaies, porter des lunettes de protection oculaire et respecter les mesures d'hygiène de base.

@nnexe : retrouvez l'annexe dans la version électronique (PDF) de cet article sur notre site www.hst.fr

BIBLIOGRAPHIE

[1] DAVID C. – Évaluation des risques des fontaines de biodégradation des graisses - Hygiène et Sécurité du Travail, n° 201, PR 20, INRS, 2005, 7 p.

[2] CHAO A, MA MC and YANG MCK. – Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika*, 1993, 80, pp. 193-201.

[3] JENNINGS E. M. et TANNER R. S. (2000) – Biosurfactant-producing bacteria found in contaminated and uncontaminated soils. *Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research*.

[4] MILLER R. M. – Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.*, 1995, 103: 59-62.

[5] WEI Y. H., LAI H. C., CHEN S. Y., YEH M. S. AND CHANG J. S. – Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SMdeltaR defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. *Biotechnol. Lett.*, 2004, 26: 799-802.

[6] AVRIL J.-L., DABERNAT H., DENIS, F. MONTEIL H. – *Bactériologie clinique*, Ellipses, 3^{ème} édition, 2000, 602 p.

[7] EUZEBY J.P. – *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire*. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico>.

[8] DAVID C. – Contamination des fluides de coupe aqueux et prévention des risques biologiques - Hygiène et Sécurité du Travail, n° 211, ND 2290, 2008, 13 p.

@nnexe

TABLEAU A I

Les 10 genres bactériens représentant plus de 1 % des colonies identifiées dans les différentes fontaines

Genres bactériens	Pourcentage de colonies isolées
<i>Providencia</i>	19,7
<i>Klebsiella</i>	16,8
<i>Pseudomonas</i>	13,1
<i>Enterobacter</i>	12,8
<i>Bacillus</i>	12,0
<i>Achromobacter</i>	10,6
<i>Stenotrophomonas</i>	5,5
<i>Citrobacter</i>	4,7
<i>Moellerella</i>	1,5
<i>Ochrobactrum</i>	1,1

TABLEAU A II

Les 13 espèces bactériennes représentant plus de 1 % des colonies identifiées dans les différentes fontaines

Espèces bactériennes	Pourcentage de colonies isolées
<i>Providencia stuartii</i>	19,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14,2
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	10,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,2
<i>Bacillus subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	9,1
<i>Enterobacter radicincitans</i>	6,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5,5
<i>Citrobacter freundii</i>	4,0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,6
<i>Moellerella wisconsensis</i>	2,6
<i>Bacillus pumilus</i>	1,5
<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i>	1,1

TABLEAU A III

Les 12 genres bactériens représentant plus de 2 % des séquences identifiées directement à partir du fluide des fontaines

Genres bactériens	Pourcentage de fragments d'ADN isolés
<i>Klebsiella</i>	25,6
<i>Citrobacter</i>	16,8
<i>Achromobacter</i>	8,9
<i>Pseudomonas</i>	8,2
<i>Providencia</i>	7,9
<i>Enterobacter</i>	6,4
<i>Ralstonia</i>	5,0
<i>Serratia</i>	4,9
<i>Ochrobactrum</i>	4,3
<i>Bordetella</i>	3,8
<i>Stenotrophomonas</i>	3,2
<i>Alkalibacterium</i>	2,2

TABLEAU A IV

Les 17 espèces bactériennes représentant plus de 1 % des séquences identifiées directement à partir du fluide des fontaines

Espèces bactériennes	Pourcentage de fragments d'ADN isolés
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>K. variicola</i>	21,8
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	8,9
<i>Citrobacter farmeri</i> / <i>C. amalonaticus</i>	8,7
<i>Citrobacter freundii</i> / <i>C. murliniae</i>	8,1
<i>Providencia stuartii</i>	7,7
<i>Serratia marcescens</i>	4,8
<i>Ralstonia pickettii</i> / <i>R. mannitolytica</i>	4,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	4,5
<i>Ochrobactrum tritici</i> / <i>O. anthropi</i>	4,3
<i>Bordetella trematum</i>	3,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,2
<i>Pseudomonas putida</i> / <i>P. stutzerii</i>	2,5
<i>Alkalibacterium olivoapovlenticus</i>	2,2
<i>Pseudomonas mendocina</i> / <i>P. pseudoalcaligenes</i>	1,9
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1,7

FIGURE A1

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le fluide de la fontaine F2

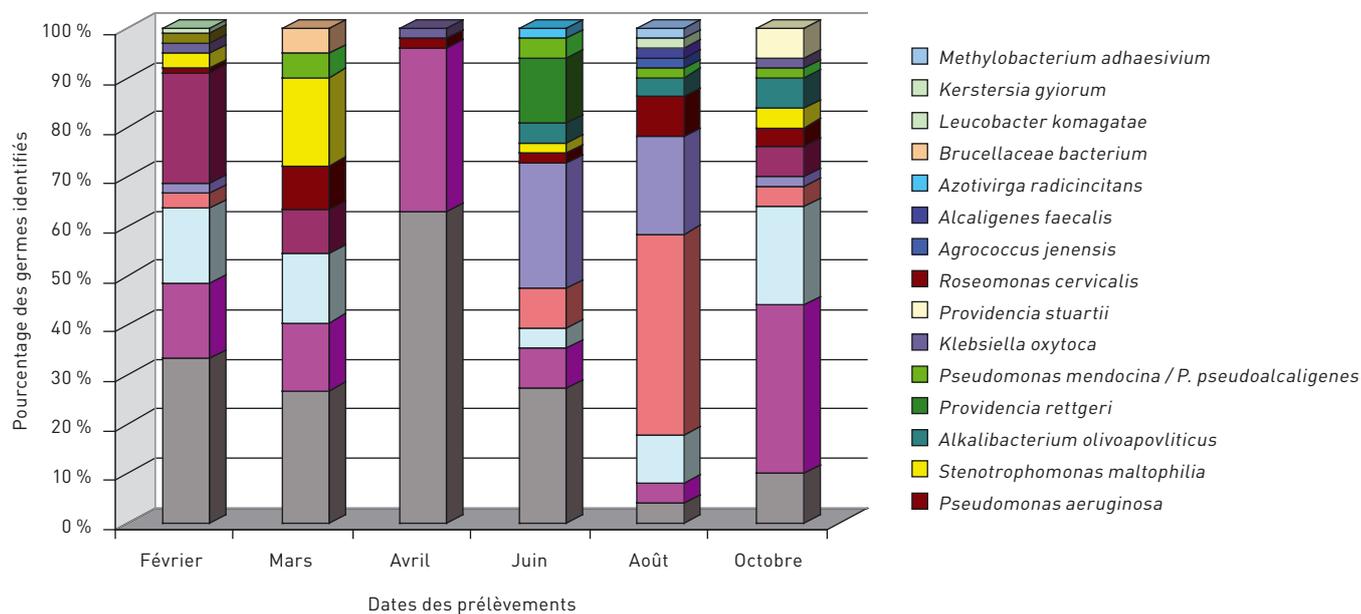


TABLEAU A V

Indices de similarité Morisita-Horn déterminés pour la fontaine F2

F2	Février	Mars	Avril	Juin	Août	Octobre
Février	100 %					
Mars	85 %	100 %				
Avril	73 %	65 %	100 %			
Juin	63 %	58 %	59 %	100 %		
Août	24 %	19 %	11 %	52 %	100 %	
Octobre	67 %	68 %	52 %	44 %	31 %	100 %

FIGURE A2

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le fluide de la fontaine F4

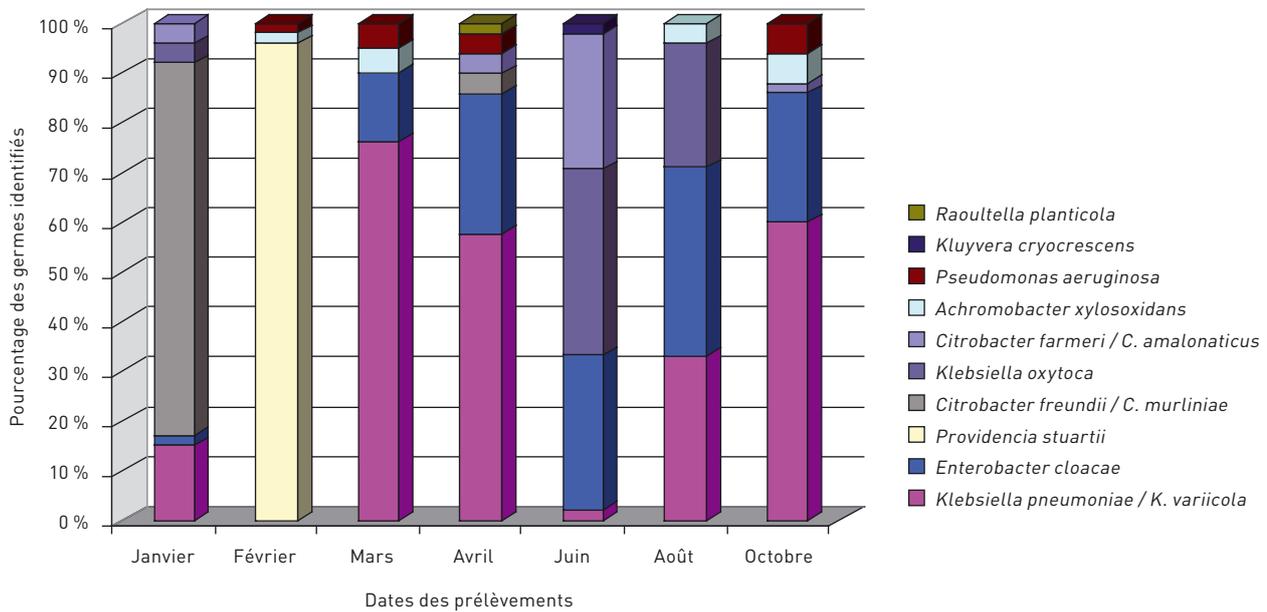


TABLEAU A VI

Indices de similarité Morisita-Horn déterminés pour la fontaine F4

F4	Janvier	Février	Mars	Avril	Juin	Août	Octobre
Janvier	100 %						
Février	0 %	100 %					
Mars	20 %	0 %	100 %				
Avril	25 %	0 %	93 %	100 %			
Juin	7 %	0 %	12 %	31 %	100 %		
Août	15 %	0 %	66 %	82 %	69 %	100 %	
Octobre	19 %	0 %	96 %	99 %	27 %	80 %	100 %

FIGURE A3

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le fluide de la fontaine F5

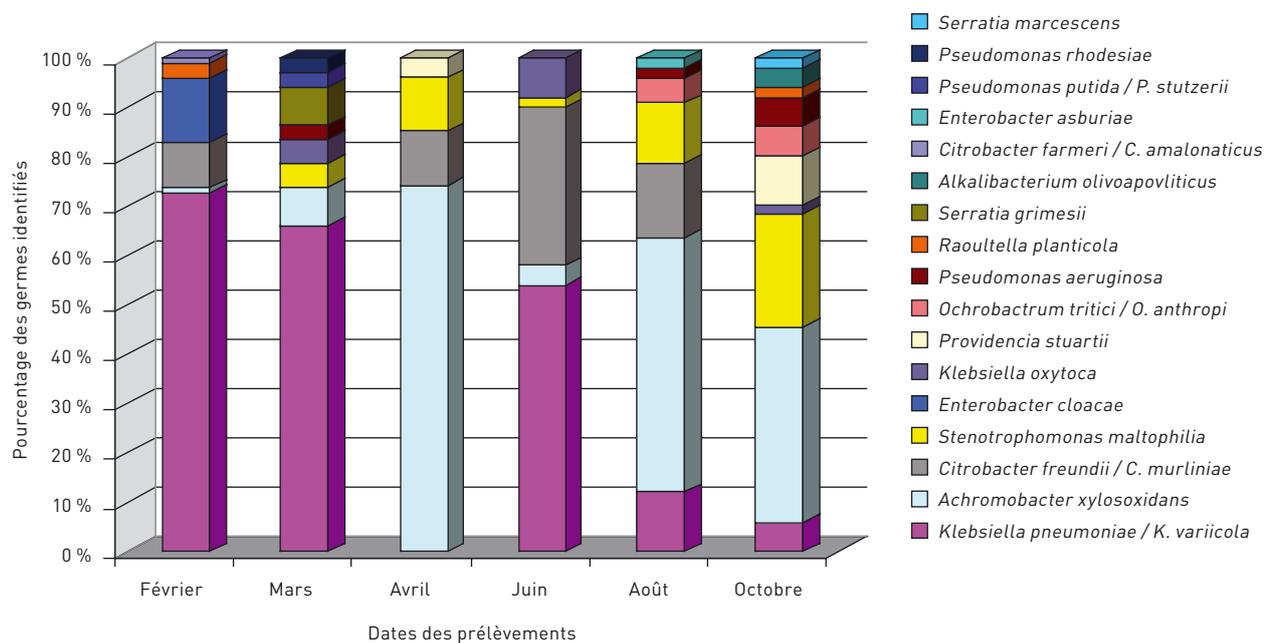


TABLEAU A VII

Indices de similarité Morisita-Horn déterminés pour la fontaine F5

F5	Février	Mars	Avril	Juin	Août	Octobre
Février	100 %					
Mars	96 %	100 %				
Avril	4 %	12 %	100 %			
Juin	88 %	85 %	13 %	100 %		
Août	25 %	32 %	91 %	38 %	100 %	
Octobre	2 %	13 %	83 %	7 %	87 %	100 %

FIGURE A4

Variation au cours du temps des différentes espèces présentes dans le fluide de la fontaine F6

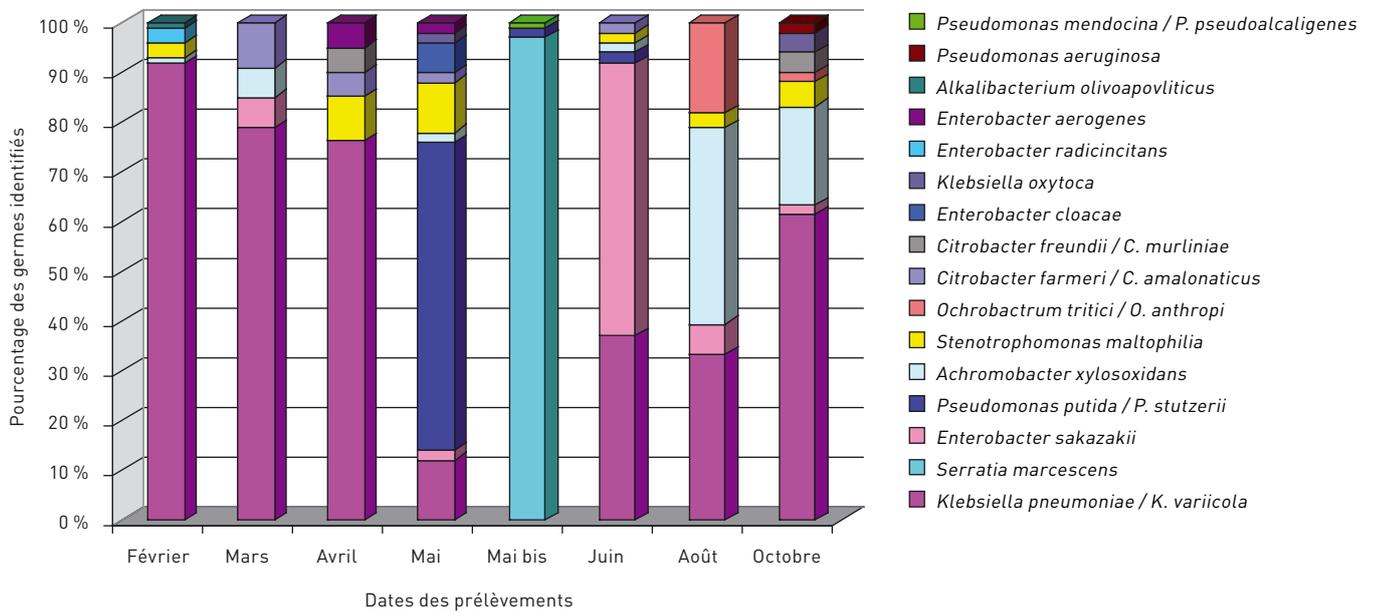


TABLEAU A VIII

Indices de similarité Morisita-Horn déterminés pour la fontaine F6

F6	Février	Mars	Avril	Mai	Mai2	Juin	Août	Octobre
Février	100 %							
Mars	98 %	100 %						
Avril	98 %	98 %	100 %					
Mai1	18 %	19 %	20 %	100 %				
Mai2	0 %	0 %	0 %	2 %	100 %			
Juin	53 %	61 %	55 %	17 %	0 %	100 %		
Août	54 %	62 %	57 %	15 %	0 %	45 %	100 %	
Octobre	90 %	94 %	93 %	20 %	0 %	56 %	79 %	100 %

TABLEAU A IX

Indices de similarité Morisita-Horn déterminés pour les fontaines F3A et F3B de 2 marques différentes placées dans le même atelier

F3A / F3B	Janvier	Février	Mars	Avril
Juin	0 %	1 %	0 %	0 %
Juillet	0 %	0 %	0 %	0 %
Août	4 %	12 %	7 %	33 %
Octobre	4 %	13 %	2 %	7 %