Pour citer cet article : Degois et al (2018), Suivi sur une année de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols émis dans un centre de tri des déchets, Congrès Français sur les Aérosols 2018, Paris

SUIVI SUR UNE ANNEE DE LA BIODIVERSITE MICROBIENNE DANS LES BIOAEROSOLS EMIS DANS UN CENTRE DE TRI DES DECHETS

J. Degois[1*], F. Clerc[1], X. Simon[1], C. Bontemps[2], P. Leblond[2], P. Duquenne[1]

[1]Laboratoire de métrologie des aérosols, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), Vandœuvre-lès Nancy, 54500, France
[2] Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR INRA 1128 IFR 110, Université de Lorraine, 54506 Vandœuvre-lès Nancy, France
*Courriel de l'orateur : jodelle.degois@inrs.fr

MICROBIAL BIODIVERSITY IN BIOAEROSOLS EMITTED IN WASTE SORTING PLANT: ONE YEAR OF FOLLOW UP

ABSTRACT

The waste sorting plants and the amount of waste which they treated increased in France. Because of the type of activity, the workers are exposed to bioaerosols which can induce adverse health effects. The composition of these bioaerosols is poorly studied. In the study, bioaerosols were collected in a French waste sorting plant during a year. The microbial biodiversity was assessed by high-throughput sequencing. An important microbial community could be observed with a dominance of Firmicutes and Proteobacteria for bacterial phyla and Ascomycota and Basidiomycota for fungal phyla. The statistical analysis highlighted a different composition between occupational bioaerosols and non-exposed reference bioaerosols. Furthermore, the fungal biodiversity seemed to be impacted by the moment (season or month) of the sampling. To improve this first information, further studies are needed to get a better understanding of the variation of the microbial biodiversity.

RESUME

Le nombre de centres de tri des déchets ainsi que la quantité de déchets triés est en constante augmentation en France. Dans ces centres, les salariés sont exposés à des bioaérosols pouvant avoir des effets néfastes pour leur santé. La composition de ces bioaérosols est très peu documentée dans la littérature. Dans cette étude, des bioaérosols ont été prélevés dans un centre de tri des déchets pendant un an, leur composition microbienne a été analysée par séquençage haut débit. Au cours de la campagne, une grande diversité bactérienne et fongique a été observée avec une prédominance des phyla bactériens Firmicutes et Proteobacteria et des phyla fongiques Ascomycota et Basidiomycota. L'analyse statistique a montré une différence de composition entre les bioaérosols émis dans le centre de tri et ceux émis dans une salle de réunion non contaminée. La biodiversité fongique semble par ailleurs dépendre du mois (saison) de prélèvement de l'échantillon. Ces premiers résultats seront confortés par des essais ultérieurs.

KEYWORDS: bioaerosols, biodiversity, waste sorting plant / **MOTS-CLES :** bioaérosols, biodiversité, centre de tri des déchets

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

En 2014, 410 centres de tri des déchets ont été recensés en France. Ils ont traité 10,4 millions de tonnes de déchets. Chaque centre emploie entre 5 et 70 salariés selon la taille du site et son niveau d'automatisation. Les déchets représentent une matrice favorable au développement de microorganismes et donc d'émission de bioaérosols (Giusti 2009). Ces bioaérosols sont peu caractérisés. Dans la plupart des études, les concentrations en microorganismes aéroportés sont déterminées grâce à des techniques culture-dépendantes, la biodiversité est ensuite caractérisée par identification des colonies (Breum et al., 1999). Bien que ces techniques permettent de renseigner des secteurs d'activités, elles restent limitées notamment par le fait que de nombreux microorganismes ne sont pas cultivables, sous-estimant ainsi la biodiversité microbienne présente dans ces bioaérosols. De nouvelles technologies basées sur les techniques de biologie moléculaire permettent maintenant de s'affranchir des limites de la culture et d'ouvrir de nouveaux champs exploratoires (Cuadros-Orellana et al., 2013). Les objectifs des travaux étaient de caractériser, sur une année, la biodiversité bactérienne et fongique des bioaérosols émis dans un centre de tri de déchets en utilisant les techniques de séquençage haut débit.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Description générale des essais

Pendant l'année 2016, chaque mois, les bioaérosols ont été prélevés dans un centre de tri des déchets. Le centre de tri a été choisi en raison de son taux d'automatisation moyen, de sa taille et du nombre de salariés (environ 50) qui en font un centre de tri représentatif de la majorité des centres de tri français. Cinq points de

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2018-12522

prélèvements ont été étudiés dans l'entreprise : 1) la zone de déchargement des déchets, 2) la cabine de pré-tri des cartons, 3) une cabine de tri, 4) le broyeur de déchets industriels banals et 5) la presse. Un sixième point de prélèvement a été placé dans une salle de réunion pour comparer les mesures de biodiversité au sein des activités de traitement de déchets par rapport à un local non contaminé par les déchets.

2.2. Prélèvements des bioaérosols

Les échantillons de bioaérosols ont été prélevés par filtration sur filtre polycarbonate (Nuclepore®, Millipore® ; 37 mm; diamètre de pores 0,8 µm) disposé dans une cassette fermée de 37mm. Les prélèvements ont été effectués en ambiance à environ 1,7 m du sol pendant 5h à un débit moyen de 10 $L.min^{-1}$. Les échantillons ont ensuite été transportés et conservés à 4°C avant leur analyse sous 24H.

2.3. Pré-traitements des échantillons

Pour éluer les particules du filtre, un volume de 5 ml d'une solution stérile (0,01% de Tween 80 dans de l'eau ultrapure) a été introduit dans les cassettes par l'orifice d'entrée. Les cassettes sont ensuite agitée à 2000 tr / min pendant 20 minutes et à température ambiante (Heildolph®, Multi-Reax shaker). L'ADN a ensuite été extrait en utilisant un kit commercialisé par MP Biomedicals (FastDNA®SPIN kit for soil) à partir de 500 µL de la solution obtenue précédemment. La quantité d'ADN extraite a été mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop), les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

2.4. Séquençages d'ADN et analyses des données issues du séquençage

Les échantillons d'ADN ont été séquencés via la technologie Illumina par un prestataire extérieur (INRA Transfert, France). La biodiversité bactérienne a été caractérisée par le séquençage de la région V3-V5 du gène ADNr 16S et la composition fongique par séquençage du marqueur ITS2. Les séquences microbiennes ont ensuite été analysées avec le logiciel Mothur (Schloss and Westcott, 2009), l'assignation des séquences bactériennes a été faite par comparaison avec les séquences de la base de données Silva et les séquences fongiques avec celles de la base UNITE. La proportion de chaque phylum et de chaque genre microbien a été calculé pour caractériser la composition microbienne des bioaérosols prélevés dans le centre de tri.

2.5. Analyses statistiques

La similarité de composition entre les bioaerosols prélevés dans l'entreprise et ceux prélevés au niveau de la référence intérieure a été évaluée grâce au calcul du coefficient de Sorensen-Dice. Ce coefficient est compris entre 0 et 1, plus il s'approche de 1 et plus les échantillons ont une composition similaire. L'impact des paramètres environnementaux sur la biodiversité a été évalué par une analyse statistique basé sur un réseau bayésien (BayesiaLab).

3. RÉSULTATS

3.1. Bilan de la campagne de prélèvement

La campagne de prélèvement a permis de collecter 84 échantillons de bioaérosols pour l'analyse de la biodiversité. Sur ces 84 échantillons, 72 échantillons bactériens et 74 échantillons fongiques ont pu être séquencés. La plupart des bioaérosols ont pu être caractérisés, les échantillons non-séquencés contenaient de faible quantité d'ADN, qui étaient probablement en dessous des limites de détection de la méthode. Ces échantillons ont été prélevés en hiver ou au niveau de la référence intérieure.

3.2. Biodiversité bactérienne

Lors de la campagne de prélèvements, une trentaine de phyla bactérien a été observée. Parmi eux, 5 étaient majoritaires : Actinobacteria, Bacteroidetes,Cyanobacteria, Firmicutes et Proteobacteria. Les Firmicutes représentaient 41% (médiane) des séquences bactériennes, dans les bioaérosols prélevés au sein des activités, les Proteobacteria en représentaient 24% (figure 1 A.). Environ 605 genres ont été détectés, parmi lesquels 57 sont apparus comme majoritaires représentant entre 9% et 83% des séquences en fonction du lieu et du moment de prélèvement. Les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Pseudomonas* ont été retrouvés en proportions importantes (supérieures à 1%) à tous les points dans l'entreprise et quel que soit le mois de prélèvement.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2018-12522

3.3. Biodiversité fongique

Six phyla fongiques ont été détectés dans les bioaérosols, les Ascomycota et les Basidiomycota étaient majoritaires quel que soit le lieu et le moment du prélèvement. Les Ascomycota représentaient 56% (médiane) des séquences ITS2 et les Basidiomycota 34%, dans les prélèvements situés au sein des activités. Au total, 592 genres fongiques ont été identifiés dans les bioaérosols. Les 52 genres majoritaires constituaient entre 58% (en octobre au niveau de la presse) et 91% (en janvier dans la cabine de pré-tri des cartons) des séquences fongiques (figure 1.B). Les genres *Wallemia*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Penicillium* et *Alternaria* étaient les genres fongiques dominants des bioaérosols prélevés dans l'entreprise. *Wallemia* pouvait représenter jusqu'à plus de 50% des séquences fongiques. Des variations des proportions de chaque phylum ou genre fongique ont été observés à tous les points lors de l'année de prélèvement.

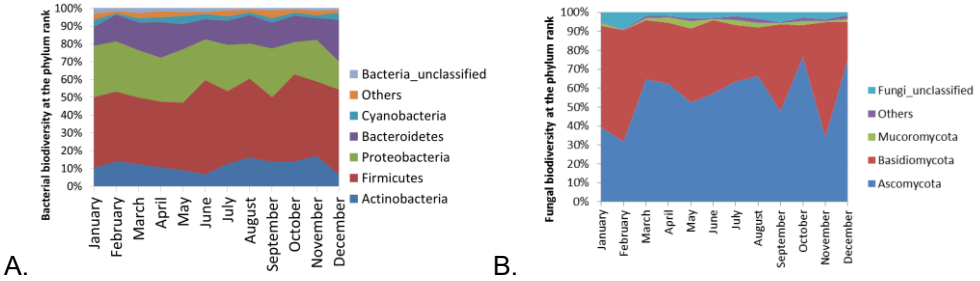

Figure 1 Biodiversité microbienne des bioaérosols prélevés dans la cabine de pré-tri des cartons au niveau du phylum : A. biodiversité bactérienne, B. biodiversité fongique.

3.4. Composition des bioaérosols : centre de tri vs référence intérieure

Le coefficient de Sorensen-Dice a permis de montrer une différence significative de composition entre la référence et les points dans l'entreprise. Pour les bactéries, il était compris entre 0,07 et 0,6. Le coefficient est plus faible en hiver et au printemps. Pour les champignons, le coefficient était minimal en hiver et en été avec des valeurs variant de 0,12 à 0,64. Le rho de Spearman a permis de corréler la valeur du coefficient de Sorensen-Dice bactérien et les valeurs de température mesurées au point de prélèvement (ρ=0,51). De même, il y a une corrélation entre le coefficient de Sorensen-Dice pour les champignons et les valeurs d'humidité relatives (ρ= -0,67). Plus les températures sont basses, plus les bioaérosols bactériens sont différents de la référence ; plus l'humidité relative est élevée, plus la biodiversité fongique dans le centre de tri est différente de celle de la référence.

3.5. Impact des facteurs environnementaux sur la composition des bioaérosols

L'objectif du réseau bayésien était de regrouper les échantillons qui avaient des compositions similaires. Cette analyse a permis de mettre en évidence un regroupement des bioaérosols fongiques en fonction du jour de prélèvement suggérant un impact de la saison sur la composition fongique des bioaérosols émis dans le centre de tri des déchets. Ceci n'a pas été constaté pour la biodiversité bactérienne. Aucun des facteurs étudiés (température, humidité relative, intensité d'activité, nombre de salariés, localisation et moment de prélèvement) n'ont permis d'expliquer la composition des différents groupes. Le ou les facteurs environnementaux influant sur la biodiversité bactérienne n'ont pas pu être identifiés à ce jour.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

La campagne de prélèvement a permis de caractériser la composition d'un grand nombre de bioaérosols microbiens collectés dans le secteur du tri des déchets. Une diversité bactérienne et fongique plus importante qu'attendue au regard des études antérieures basées sur la culture a pu être analysée. Une variation importante du nombre de taxons en présence ainsi que leur proportion a pu être observé aux différents points de prélèvements durant cette année de campagne. Les bioaérosols émis dans les centres de tri des déchets ont donc une composition complexe et hétérogène au cours du temps. Il y a des différences significatives de composition microbienne entre l'air prélevé au sein des activités et l'air d'un bureau non contaminé par les déchets. L'analyse statistique a également permis de mettre en évidence une influence du moment de prélèvement sur les résultats de biodiversité fongique. Pour approfondir les premiers résultats, des essais complémentaires seront menés afin de caractériser la variation de la biodiversité à court terme (à l'échelle de la semaine et du mois). Par ailleurs, d'autres centres de tri seront investigués pour identifier un ou plusieurs taxons microbiens spécifiques des centres de tri des déchets.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2018-12522

5. RÉFÉRENCES

Breum, N.O., Würtz, H., Midtgaard, U., Ebbehøj, N. (1999). Dustiness and bio-aerosol exposure in sorting recyclable paper, Waste Management and Research, 17(2), 100-108.

Cuadros-Orellana, S. L., Rabelo Leite, A., Smith, J., Dutra Medeiros, F., Badotti, P. L., Fonseca, A. B., Vaz, G., Góes-Neto, A. (2013). Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. Fungal Genetics and Biology 3(2).

Giusti, L. (2009). A review of waste management practices and their impact on human health. Waste Management, 29(8), 2227-2239.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn D. J., Weber C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology ,75(23),7537-7541.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2018-12522