

## COMPARAISON DES PERFORMANCES DE QUATRE BIOCOLLECTEURS DANS L'AIR DES LIEUX DE TRAVAIL : FILTRATION VS. VOIE LIQUIDE

X. Simon<sup>\*1</sup>, P. Duquenne<sup>2</sup>, C. Coulais<sup>1</sup>, V. Koehler<sup>1</sup>, C. Dziurla<sup>1</sup> et P. Wild<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Métrologie des Aérosols,

<sup>2</sup>Laboratoire d'analyses spatiales et temporelles des expositions chimiques, <sup>3</sup>Direction Scientifique Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 54519 Vandoeuvre Les Nancy, France

\*Courriel de l'orateur : xavier.simon@inrs.fr

### TITLE

**Field comparison of four bioaerosol samplers: collection onto a filter vs. liquid-based collectors**

### ABSTRACT

Liquid-based collectors use a gentler sampling process and are supposed to provide better microorganisms recovery than closed-face cassette (CFC). However, their use in field studies is scarce and comparisons with CFC are not documented. Our objective was to compare culturable microorganisms concentrations obtained with CFC to those measured with three liquid-based samplers in four occupational atmospheres. 42 side-by-side static comparisons were performed. Culturable concentrations by liquid-based samplers were frequently lower than those measured by CFC.

### RESUME

Une collecte en voie liquide permettrait de ne pas sous-estimer les concentrations des microorganismes les plus fragiles par rapport à un prélèvement sur filtre (CFC). Cependant, le recours à des biocollecteurs en voie liquide est peu répandu sur le terrain et les comparaisons avec les résultats par CFC ne sont pas documentées. L'objectif était de comparer les concentrations en microorganismes cultivables mesurées par CFC à celles mesurées avec trois biocollecteurs en voie liquide dans quatre atmosphères professionnelles. 42 mesures comparatives ont été réalisées à points fixes. Les concentrations mesurées en voie liquide étaient quasi-systématiquement plus basses que celles mesurées par CFC.

**KEYWORDS:** Bacteria, fungi, culturable microorganisms, particle size distribution

**MOTS-CLES :** Bactéries, moisissures, microorganismes cultivables, distribution granulométrique

## 1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

L'évaluation des expositions aux bioaérosols en utilisant la méthode d'analyse par culture de microorganismes sur boîtes de Pétri présente des inconvénients et fournit des résultats quantitatifs avec des incertitudes élevées. Pour autant, elle reste très utilisée par les préventeurs et les hygiénistes du travail. Ils peuvent ainsi distinguer des zones « peu contaminées » de postes de travail présentant des concentrations anormalement élevées et dans lesquels les expositions doivent être prioritairement réduites.

Le prélèvement par cassette fermée (CFC, couplée à une analyse par culture), principalement utilisé en France, constitue une méthode facile à déployer pour réaliser des mesures dans les atmosphères de travail : elle est simple à mettre en œuvre, bien connue des préleveurs et relativement peu coûteuse. De plus, elle permet de mesurer des concentrations individuelles sur les salariés, sur la totalité de la durée du travail et avec une efficacité d'échantillonnage représentative de la fraction inhalable pour une large gamme de diamètres de particules (Görner *et al.*, 2010). L'utilisation d'une CFC pour le prélèvement de spores de moisissures et de certaines bactéries sporulantes est bien admise par la communauté scientifique car ces entités ne sont pas ou peu sensibles au stress induit par une collecte par filtration, même pour des durées de prélèvement de plusieurs heures (Durand *et al.*, 2002 ; Lin et Li, 1998 ; Wang *et al.*, 2001). Le recours à une CFC est même conseillé pour certains environnements (compostage, milieux agricoles, etc.) dans lesquels ces microorganismes sporulants, majoritairement hydrophobes, sont présents en grande proportion.

Cependant, sur la base de travaux de laboratoire menés avec des souches modèles sensibles (*E. coli*, *P. fluorescens*), la filtration est considérée comme une méthode de prélèvement stressante qui peut conduire à une diminution de la cultivabilité chez certains microorganismes sensibles, comme les cellules végétales bactériennes (Crook *et al.*, 1997 ; Jensen *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 1999 ; Macher & First, 1984 ; Wang *et al.*, 2001). Le stress subi au cours de ce mode de collecte provient majoritairement de l'impaction initiale des cellules sur le filtre et de leur dessiccation ultérieure causée par le passage d'air pendant la durée du prélèvement (Jensen *et al.*, 1992 ; Stewart *et al.*, 1995). Certains de ces travaux de laboratoire démontrent qu'un prélèvement en voie liquide peut être avantageux par rapport à un prélèvement sur filtre dans une cassette fermée (CFC) afin de ne pas sous-estimer les concentrations en bactéries cultivables. Nos propres essais de laboratoire confirment que les biocollecteurs en voie liquide permettent de mieux préserver la cultivabilité de cellules d'*E. coli* au cours du prélèvement par rapport à la CFC. Nos résultats montrent que

les concentrations par CFC peuvent être environ 10 à 10000 fois inférieures à celles mesurées par un BioSampler ou un Frit-Bubbler, en fonction des conditions opératoires. Le recours à des biocollecteurs en voie liquide est toutefois peu répandu sur le terrain et les comparaisons avec les résultats par cassette fermée ne sont pas documentées dans les atmosphères professionnelles.




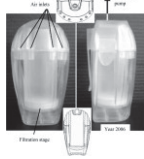
L'objectif de cette étude était de comparer, dans des milieux de travail contaminés par des microorganismes, les concentrations en bactéries et moisissures cultivables mesurées par CFC à celles mesurées avec trois biocollecteurs en voie liquide : BioSampler, CIP 10-M et Frit-Bubbler.

## 2. MATERIELS ET METHODES

La comparaison des performances des biocollecteurs a été menée dans quatre entreprises : 2 stations d'épuration des eaux de grandes agglomérations (STEP-1 et STEP-2, capacités nominales de 440000 et 500000 équivalents-habitants, respectivement), 1 centre de tri et de valorisation des déchets recyclables (CTD, 17195 tonnes de matériaux triés en 2016) et 1 ferme-élevage d'environ 1000 cochons (EC).

Les caractéristiques des quatre biocollecteurs étudiés sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Présentation des quatre dispositifs de prélèvement de bioaérosols étudiés

Nom	Cassette fermée 37 mm (CFC)	BioSampler (BS)	CIP 10-M (CIP)	Frit-Bubbler (FB)
Photo / schéma				
Mode de collecte	Filtration – membrane polycarbonate 0,8 µm	Voie liquide (20 mL de fluide)	Voie liquide (2,5 mL de fluide)	Voie liquide (40 mL de fluide)
Débit (L.min <sup>-1</sup> )	2	12,5	10	4

(a) tiré de Agranovski (2007)

Le fluide de collecte était une solution stérile de tampon phosphate amendé d'un dispersant, d'un agent anti-mousse et d'un agent protecteur bactérien (2,12 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,99 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,76 g de NaCl, 0,01 g de Tween80, 0,5 g d'Antifoam A et 0,586 g de bétaïne dans 1 L d'eau purifiée de type 2).

Les biocollecteurs étaient disposés sur des barres de prélèvement, à point fixe et à hauteur des voies respiratoires (Figure 1). Le positionnement des dispositifs sur la barre était modifié aléatoirement d'un jour à l'autre. Différents points ont été explorés dans chacune des entreprises. La durée de prélèvement était d'environ 5 h. L'évaporation du fluide de collecte aqueux nécessitait des ajouts périodiques de liquide dans les réservoirs des BS, CIP et FB au cours du prélèvement. Des mesures complémentaires de distribution granulométrique des aérosols ont été réalisées avec des impacteurs en cascade Marple.



Figure 1. Photographies de la barre de prélèvement pour la comparaison des biocollecteurs

Les échantillons étaient acheminés le jour même vers le laboratoire (transport et stockage à 4°C) où ils étaient analysés dans les 24 h après la fin des prélèvements. Les moisissures ont été cultivées sur milieu MEA et les bactéries sur milieux TSA/actidione et EMB (25°C pendant 5 jours). Le dénombrement des colonies sur gélose permet d'obtenir des résultats de concentrations exprimés en Unités Formant Colonies par mètre cube d'air prélevé par chaque biocollecteur (UFC.m<sup>-3</sup>).

Les valeurs de concentrations mesurées avec les biocollecteurs en voie liquide et celles mesurées avec la CFC ont été comparées, pour chaque entreprise séparément, par une analyse statistique basée sur un modèle de régression de Poisson.

### 3. RESULTATS

Au total, 42 points de comparaison ont été réalisés sur de larges gammes de concentrations en bactéries cultivables ( $[CFC]_{\min} = 1,6 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$  ;  $[CFC]_{\max} = 1,9 \cdot 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$  ; Figure 2) et en moisissures cultivables ( $[CFC]_{\min} = 1,9 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$  ;  $[CFC]_{\max} = 9,6 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ ). Les atmosphères professionnelles des stations d'épuration, des centres de tri de déchets et d'élevage de cochon présentent par ailleurs des compositions en espèces bactériennes et fongiques profondément différentes. La diversité des bioaérosols prélevés constitue ainsi une richesse de situations rencontrées lors de l'étude comparative des biocollecteurs.

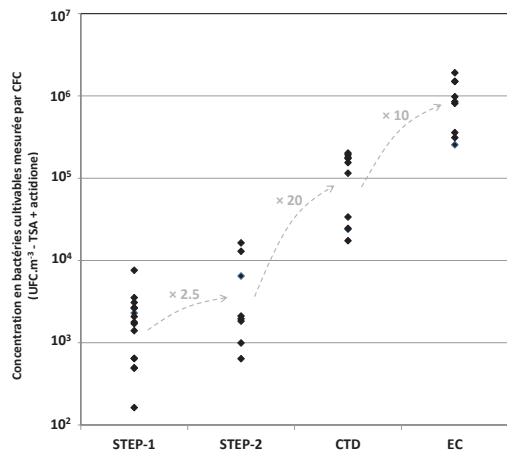


Figure 2. Concentrations en bactéries cultivables mesurées par CFC dans les 4 entreprises.

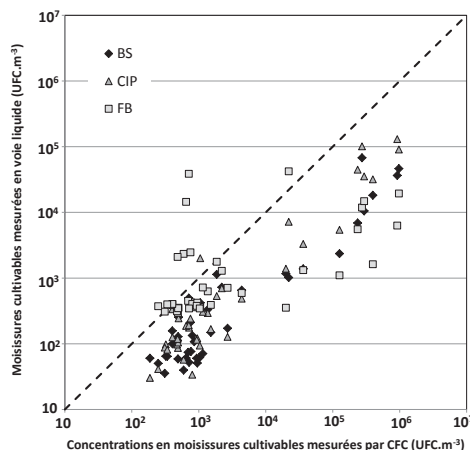


Figure 3. Concentrations en moisissures cultivables mesurées par collecte en liquide (BS, CIP, FB) vs. CFC

Comme attendu pour des entités sporulantes hydrophobes, les concentrations en moisissures cultivables mesurées en voie liquide étaient quasi-systématiquement inférieures à celles mesurées par CFC (Figure 3). Seules 10 valeurs de concentrations (sur 124) mesurées en voie liquide étaient supérieures à celles mesurées par CFC ; elles correspondaient à des prélèvements par FB réalisés dans l'élevage de cochons.

La Figure 4 permet de comparer les concentrations mesurées par chacun des dispositifs de prélèvement en voie liquide (BS, CIP, FB de gauche à droite) avec ceux mesurés par CFC.

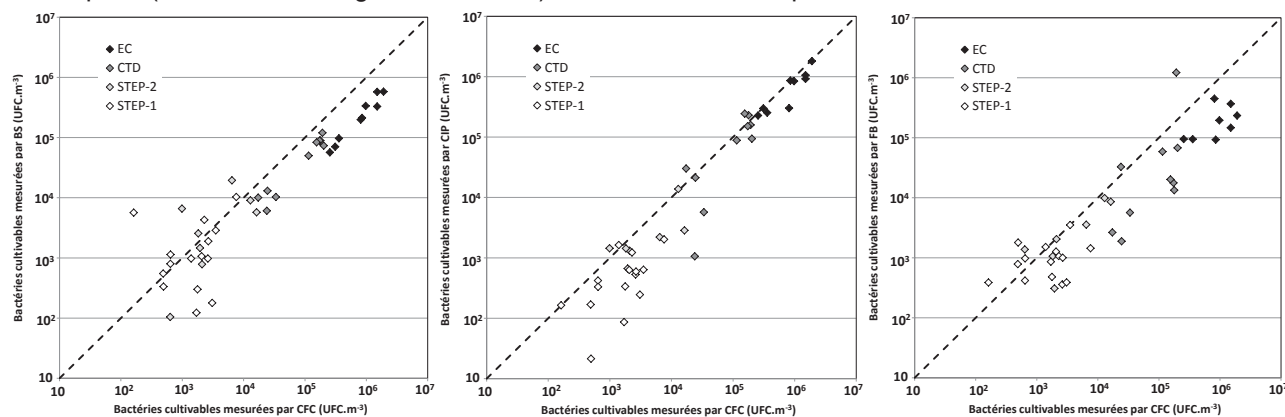


Figure 4. Concentrations en moisissures cultivables mesurées par collecte en liquide (BS, CIP, FB) vs. CFC

Quel que soit le biocollecteur considéré, les concentrations en bactéries cultivables mesurées en voie liquide dans le CTD et l'EC étaient significativement inférieures à celles mesurées par CFC ( $p_{\text{CTD}} \leq 0,010$ ,  $n=10$  et  $p_{\text{EC}} \leq 0,019$ ,  $n=9$ ). Pour les deux STEP, le CIP fournit également des concentrations en bactéries cultivables significativement inférieures à celles mesurées par CFC ( $p_{\text{STEP-1}} \leq 0,012$ ,  $n=15$  ;  $p_{\text{STEP-2}} \leq 0,015$ ,  $n=8$ ) ; les résultats concernant le BS et le FB sont plus contrastés mais les concentrations supérieures à celles par CFC étaient seulement au nombre de 9 et de 6 (sur 23 au total) pour le BS et le FB, respectivement.

Des exemples de distributions granulométriques en bactéries cultivables en fonction du diamètre aérodynamique des particules sont présentés sur la Figure 5. On constate que la majorité des bactéries cultivables dans les atmosphères de travail du CTD et de l'EC présentent des diamètres aérodynamiques compris entre 6 et 40  $\mu\text{m}$ . Ces particules correspondent donc majoritairement à des entités bactériennes complexes (agglomérats avec d'autres bactéries, microorganismes ou particules solides) et non pas à des bactéries isolées qui posséderaient des diamètres aérodynamiques plus petits, de l'ordre du micromètre. D'autres travaux suggèrent que, contrairement aux spores, les cellules de bactéries sont aérosolisées dans l'air des lieux de travail préférentiellement sous forme d'agglomérats (Clauss, 2015).

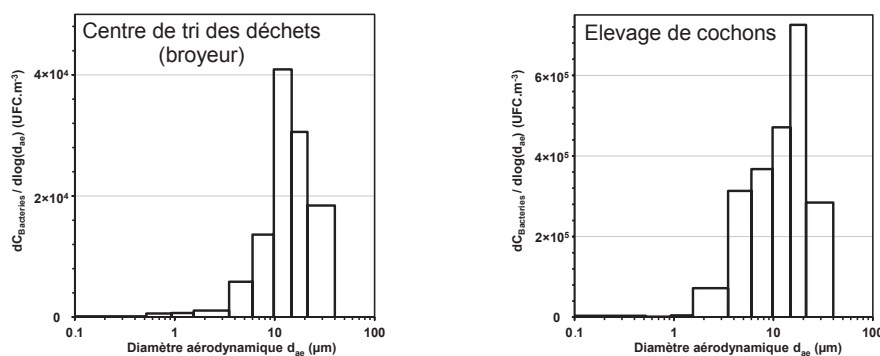


Figure 5. Distribution granulométrique des bactéries cultivables dans le CTD (broyeur) et dans l'EC

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats concernant les moisissures confirment les conclusions de précédents travaux de laboratoire qui montraient que

- (1) les entités fongiques n'étaient pas ou peu sensibles au stress induit par une collecte par filtration (Durand *et al.*, 2002 ; Lin et Li, 1998 ; Nasman *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2001) ;
- (2) les microorganismes hydrophobes possédaient une efficacité de collecte médiocre dans un liquide aqueux se traduisant par des pertes de particules par transfert vers l'aval et par dépôts sur les parois internes des biocollecteurs (Grinshpun *et al.*, 1997 ; Han et Mainelis, 2012 ; Lin *et al.*, 1997 ; Muilenberg, 1989 ; Riemenschneider *et al.*, 2010).

Les résultats des comparaisons de concentrations en bactéries cultivables, obtenus dans des atmosphères professionnelles, sont très différents de ceux obtenus par de précédents travaux expérimentaux de comparaison menés au laboratoire sur des espèces modèles. Des différences fondamentales existent en effet entre les deux approches : (1) la taille des entités bactériennes cultivables mesurés dans les essais de terrain correspond à des agglomérats complexes et non pas à des cellules végétatives isolées comme celles générées dans les essais de laboratoire ; (2) les formes sauvages rencontrées sur le terrain sont très diversifiées et ont acquis une résistance adaptée à leur survie (Marthi *et al.*, 1990 ; Walter *et al.*, 1990) et un comportement dans l'air et au cours du prélèvement qui peut être très différent de celui des souches modèles sensibles étudiées au laboratoire (*E. coli*, *P. fluorescens*).

La propension des bactéries à être aérosolisées dans l'air des lieux de travail sous forme d'agglomérats peut engendrer des changements de comportement de ces entités bactériennes. Elles peuvent ainsi acquérir un comportement hydrophobe similaire à celui décrit pour les microorganismes sporulants et qui diminuerait l'efficacité de leur collecte en voie liquide. Elles peuvent également développer une résistance plus grande aux stress d'un prélèvement par filtration par rapport à des cellules végétatives isolées (Amato *et al.*, 2015 ; Dossow et Müller, 1988 ; Handley et Webster, 1995).

Les résultats de cette étude ne militent pas pour un remplacement de la cassette fermée par une méthode en voie liquide pour le prélèvement des microorganismes cultivables. Les résultats mériteraient toutefois d'être confirmés dans de plus nombreux environnements de travail.

#### 5. REFERENCES

- Agranovski, I.E. (2007) *Clean* 35(1), 111-117.
- Amato, P., Joly, M., Schaupp, C., Attard, E., Möhler, O., *et al.* (2015) *Atmos. Chem. Phys.* 15(11), 6455-6465.
- Clauss, M. (2015) *Appl. Agri. Forest. Res. Landbauforschung* 65(2), 77-100.
- Crook, B., Kenny, L.C., Stagg, S., Stancliffe, J.D., Futter, S.J., Griffiths, W.D. and Stewart, I.W. (1997) *Ann. Occup. Hyg.* 41, 647-652.
- Dossow, A.V. and Müller, W. (1988) *Environ. Anim. Health: proceedings of the 6<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Hyg.*, Skara, Sweden, 416-419.
- Durand, K.H., Muilenberg, M.L., Burge, H.A. and Seixas, N.S. (2002) *Ann. Occup. Hyg.* 46(1), 113-118.
- Görner, P., Simon, X., Wrobel, R., Kauffer, E. and Witschger, O. (2010) *Ann. Occup. Hyg.* 54(2), 165-187.
- Grinshpun, A.S., Willeke, K., Ulevicius, V., Juozaitis, A., Terzieva, S. *et al.* (1997) *Aerosol Sci. Tech.* 26(4):326-342.
- Han, T. and Mainelis, G. (2012) *J. Aerosol Sci.* 45, 58-68.
- Handley, B.A. and Webster, A.J. (1995) *J. Appl. Bacteriol.* 79(4), 368-378.
- Jensen, P.A., Todd, W.F., Davis, G.N. and Scarpino, P.V. (1992) *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 53(10), 660-667.
- Li, C.S., Hao, M.L., Lin, W.H., Chang, C.W. and Wang, C.S. (1999) *Aerosol Sci. Tech.* 30(2), 100-108.
- Lin, X., Willeke, K., Ulevicius, V. and Grinshpun, A.S. (1997) *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 58, 480-488.
- Lin, W.H. and Li, C.S. (1998) *Aerosol Sci. Tech.* 28(6), 511-522.
- Macher, J.M. and First, M.W. (1984) *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45, 76-83.
- Marthi, B., Fieland, V.P., Walter, M. and Seidler, R.J. (1990) *Appl. Environ. Microb.* 56(11), 3463-3467.
- Muilenberg, M.L. (1989) *Immunol. Allergy Clin.* 9(2), 245-268.
- Nasman, A., Blomquist, G. and Levin, J.O. (1999) *J. Environ. Monitor.* 1, 361-365.
- Riemenschneider, L., Woo, M.-H., Wu, C.-Y., Lundgren, D., Wander, J. *et al.* (2010) *J. Appl. Microb.* 108(1), 315-324.
- Stewart, S.L., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Terzieva, S., Ulevicius, V. and Donnelly, J. (1995) *Appl. Environ. Microb.* 61(4), 1232-1239.
- Walter, M.V., Marthi, B., Fieland, V.P. and Ganio, L.M. (1990) *Appl. Environ. Microb.* 56(11), 3468-3472.
- Wang, Z., Reponen, T., Grinshpun, A.S., Gorny, L.R. and Willeke K. (2001) *J. Aerosol Sci.* 32(5), 661-674.

Pour citer cet article : Simon *et al.* (2018), Comparaison des performances de quatre biocollecteurs dans l'air des lieux de travail : filtration vs. voie liquide, Congrès Français sur les Aérosols 2018, Paris