IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DE BIOAEROSOLS DANS UNE FROMAGERIE AVEC UNE APPROCHE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

L. Alonso[1], C. Dziurla[1], C. Coulais[1], P. Duquenne[2] et X. Simon[1]

[1] Laboratoire de Métrologie des Aérosols
[2] Laboratoire d'Analyses Spatiales et Temporelles des Expositions Chimiques
INRS, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France
*Courriel de l'orateur : lise.alonso@inrs.fr

TITLE

Identification and quantification of bioaerosols in a cheese factory with a molecular biology approach

RESUME

La communauté microbienne des bioaérosols d'une fromagerie a été étudiée à l'aide de techniques de biologie moléculaire dans le cadre d'une démarche de prévention. Les bactéries et moisissures ont été quantifiées par PCR quantitative et identifiées grâce au séquençage haut débit, dans six zones d'activités de la fromagerie. La prédominance du genre fongique *Penicillium* et du genre bactérien *Afipia* a été observée. Les résultats indiquent aussi que la quantité de moisissures est nettement supérieure à la référence intérieure lors des activités de soins apportées aux fromages et que la composition de la communauté microbienne est différente en fonction de l'activité. La composition des bioaérosols en fromagerie est peu documentée ou essentiellement via une approche de cultivabilité. Ce travail présente donc une approche globale de caractérisation des bioaérosols et permet d'enrichir les connaissances sur ce type d'atmosphère professionnelle.

ABSTRACT

The microbial community of bioaerosols from a cheese factory has been studied using molecular biology techniques as part of a prevention approach. Bacteria and fungi were quantified by PCR and identified with high-throughput sequencing, in six working areas of the dairy. The predominance of the fungal genus *Penicillium* and the bacterial genus *Afipia* has been observed. The results indicate that fungi concentration is significantly higher than the internal reference during cheese care activities and that the composition of the microbial community is different depending on the activity. The composition of bioaerosols in dairy is poorly documented or often via a culture approach, so this study allows for a global approach.

MOTS-CLÉS: bioaérosols, biodiversité, fromagerie / **KEYWORDS:** bioaerosols, biodiversity, cheese factory

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Dans le cadre d'une démarche préventive globale, une campagne de mesurage de polluants de l'air a été réalisée en janvier 2020 au sein d'une entreprise fromagère produisant une dizaine de fromages différents. La fromagerie est équipée de plusieurs hâloirs d'affinage, dans lesquels sont entreposés les fromages dans des conditions (durée, température, humidité relative de l'air) liées au type de fromage. Lors de cette campagne, des polluants chimiques et biologiques ont été prélevés grâce à des méthodes en temps-réel et en différé (Duquenne *et al.*, 2020). Les bioaérosols présents dans les atmosphères du secteur agroalimentaire, notamment les fromageries, sont peu étudiés, et les études réalisées ont utilisé des méthodes culturales qui ne permettent pas l'accès à la globalité des bioaérosols. Dans ce contexte, cette étude est consacrée à la quantification et l'identification de la totalité des bioaérosols dans différentes zones de travail d'une fromagerie grâce à la PCR quantitative et au séquençage haut débit. L'objectif est d'utiliser les méthodes de biologie moléculaire afin de mieux caractériser les bioaérosols présents dans cette atmosphère de travail.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Prélèvements des bioaérosols

Onze échantillons ont été prélevés en ambiance dans six zones de travail du 14 au 16 janvier 2020 dans une fromagerie, afin d'évaluer et déterminer les concentrations de bioaérosols selon les différentes tâches réalisées. Les six zones de travail correspondent à : 1) « Fromage 1 soin 1 » qui consiste en un brossage mécanique des fromages avec une saumure; 2) « Fromage 1 soin 2 » pour lequel un brossage manuel avec une saumure est effectué; 3) « Fromage 2 » correspondant au hâloir d'un autre fromage à pâte molle et à croûte fleurie; 4) « Autres fromages » correspondant au hâloir d'autres fromages à pâte molle et à croûte fleurie; 5) « Emballage fromages », zone dans laquelle les fromages sont emballés et 6) une « référence intérieure » correspondant à un bureau situé dans la zone administrative de l'entreprise. Les dispositifs de

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2021-24828 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

prélèvement ont été placés à hauteur des voies respiratoires à environ 1,7 m du sol sur une barre horizontale soutenue par un système de type pied photo.
Les prélèvements ont été effectués par filtration à l'aide de cassettes fermées en polypropylène et constituées de 3 pièces (Millipore®, France). Les cassettes contenaient un tampon (Absorbant pad, Millipore, France) et une membrane en polycarbonate de 37 mm de diamètre et de diamètre de pores de 0,8 µm (Nuclepore® Polycarbonate, Millipore, France). Pour le prélèvement, les cassettes fermées étaient chacune connectées à une pompe individuelle (SG 10-2, GSA) assurant un débit nominal moyen de 10 L/min. Cette configuration permet d'assurer une efficacité de captage comprise entre 100% et ~40% jusqu'à des particules de l'ordre de ~20 µm en diamètre équivalent aérodynamique. Le débit de chaque pompe a été mesuré avant et après le prélèvement à l'aide d'un débitmètre. Après le prélèvement, les cassettes ont été rebouchées et transportées jusqu'au laboratoire dans une enceinte réfrigérée sous 24 heures.

2.2. Elution des cassettes de prélèvements et extraction d'ADN

Pour extraire les microorganismes collectés dans la cassette, un volume de 10 mL d'une solution d'extraction (Tween 80 0,01%, peptone 0,1%) a été introduit directement dans la cassette puis, cette dernière a été agitée pendant 20 min à 2000 rpm (Multi-Reax®, Heildolph). Cette suspension a été conservée à -20°C pendant 2 à 5 jours avant extraction. Une fraction de cette suspension (500µl) a été utilisée pour réaliser une extraction d'ADN à l'aide du kit FastDNA Spin for soil, MPBiomedicals. L'ADN extrait a été quantifié grâce à une méthode de quantification fluorimétrique proposée sous la forme d'un kit Qubit 1X dsDNA HS Assay. Les extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.3. Quantification des moisissures et bactéries par PCR

Pour évaluer le nombre de gènes d'ARNr 16S bactériens et de gènes d'ARNr 18S fongiques, les PCR quantitatives (qPCR) ont été réalisées sur un CFX 96 (Bio-Rad) en utilisant les amorces Bactot 1F 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' / Bactot 1R 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' et FungiQuant-F 5'-GGRAAACTCACCAGGTCCAG-3' / FungiQuant-R 5'-GSWCTATCCCCAKCACGA-3', respectivement.

2.4. Séquençage haut débit

Pour étudier la diversité de la communauté microbienne de façon globale, la méthode de séquençage haut débit Illumina a été choisie. Deux marqueurs génétiques de diversité microbienne ont été étudiés : les gènes ARNr 16S spécifiques aux bactéries et *l'Internal Transcribed Spacer* 1 (ITS1) spécifiques aux champignons. Pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S, les amorces ciblant les régions V4-V5 ont été utilisées. Le séquençage haut débit a été réalisé par INRAE transfert (Narbonne), en utilisant la chimie appariée Illumina MiSeq 2 x 250 pb pour obtenir entre 30 000 et 100 000 séquences par échantillon.

2.5 Analyse bioinformatique des séquences pour l'identification des bioaérosols

L'analyse des séquences a été réalisée sur la plateforme Galaxy Migale à l'aide du pipeline de traitement de données FROGS (Escudié *et al*., 2018). Le traitement de données est réalisé en plusieurs étapes, les séquences sont assemblées avec un maximum de 10% de discordance dans la région superposée, puis les séquences n'ayant pas la longueur attendue (c'est-à-dire 200 à 500 pb) ou contenant des bases ambiguës (N) ont été supprimées. Ensuite, les séquences sont regroupées grâce à l'outil SWARM, en fonction de leur degré de similarité afin de former un groupe ou cluster associé à un OTU (Unité opérationnelle taxonomique). Les séquences chimériques ont ensuite été éliminées en utilisant VSEARCH et les séquences de faible abondance ont été filtrées à ≥ 0,005%, c'est-à-dire en conservant les OTU représentant au moins 0,005% de toutes les séquences. Pour finir, l'affiliation taxonomique a été réalisée avec la base de données SILVA 138 pour les bactéries et la base de données ITS UNITE Fungi 8.0 pour les champignons.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Pour chaque activité, la concentration de bactéries et de moisissures a été mesurée (Figure 1) grâce à la PCR quantitative. Pour la référence intérieure, le nombre de copie de gène ARNr 16S bactérien est de 4.10^4 copies/m^3 d'air ce qui est du même ordre de grandeur que pour les autres zones d'activités avec une concentration comprise entre $2,4.10^4$ et $6,1.10^4$ copies/m^3 d'air. En revanche, l'activité « Fromage 1 soin 2 » se détache avec $3,8.10^5$ copies/m^3 soit 10 fois plus que la référence intérieure. Concernant les moisissures, la concentration pour la référence intérieure est de $3,4.10^4$ copies/m^3 c'est-à-dire environ 10000 fois moins que pour l'activité « Fromage 1 soin 1 » (~1.10^8 copies/m^3) et 1000000 fois moins que pour l'activité « Fromage 1 soin 2 » (~1.10^{10} copies/m^3).

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2021-24828 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

La concentration de moisissures est donc beaucoup plus élevée dans les zones d'activité que dans la zone de référence. L'activité « Fromage 1 soin 2 » est celle qui comporte la plus forte concentration de bactéries et de moisissures. Ces résultats indiquent que le brossage favorise la mise en suspension de microorganismes dans l'air sur ce poste de travail.

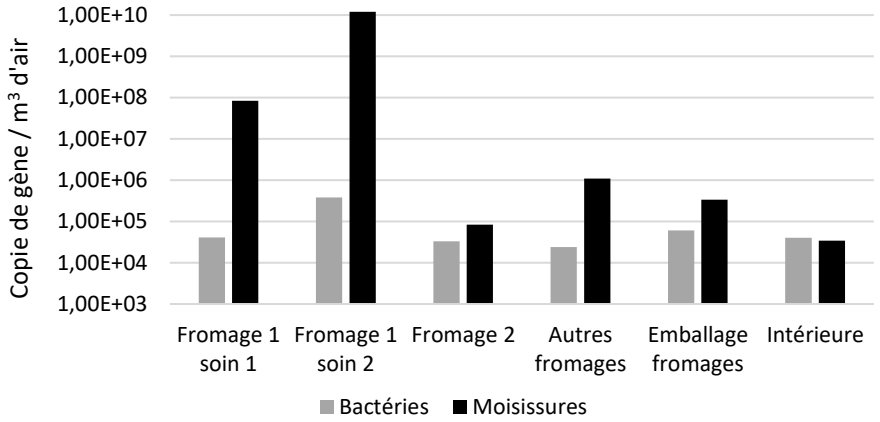

Figure 1. Concentration de bioaérosols en nombre de copies de gène par m³ d'air en fonction de l'activité

Une fois quantifiée, la composition de la communauté microbienne a été identifiée (Figure 2). La communauté bactérienne diffère selon l'activité (Figure 2.A), cependant, le genre bactérien *Afipia* est retrouvé majoritairement pour toutes les activités. C'est une bactérie mésophile de la famille des Bradyrhizobiaceae, retrouvée dans des environnements comme le lait (Chamberland *et al*., 2017) ou les réseaux de distribution d'eaux des hôpitaux. Le genre *Brevibacterium* n'est présent que pour les activités « Fromage 1 soin 1 » et « Fromage 1 soin 2 » et les genres bactériens *Escherichia-Shigella* et *Shingomonas* sont plus abondants pour les activités « Fromage 2 », « Emballage fromages » et la référence intérieure que pour les autres activités. Le genre bactérien *Brevibacterium* entre dans la composition de ferments lactiques appliqués dans la masse ou en surface du Fromage 1, ce qui explique sa présence spécifique dans les activités de soin. Ce résultat suggère également qu'il n'y a pas d'échanges de bioaérosols entre les différentes salles. Pour résumer, la composition de la communauté bactérienne de l'activité « Fromage 1 soin 1 » est proche de celle de l'activité « Fromage 1 soin 2 » mais diffère de toutes les autres activités. La communauté bactérienne des activités Fromage 2, Emballage fromages et la référence intérieure sont proches entre elles et la communauté de l'activité « Autres fromages » se distingue des autres.
La composition de la communauté fongique diffère selon l'activité (Figure 2.B), 18 espèces fongiques différentes ont été identifiées. *Penicillium* est le genre majoritaire pour toutes les activités, excepté pour le Fromage 2 pour lequel le genre majoritaire est *Cladosporium*. La communauté fongique du Fromage 2 est d'ailleurs celle qui diffère le plus des communautés fongiques des autres activités.
Le genre *Penicillium* est communément retrouvé dans les produits laitiers et particulièrement les fromages car il entre dans le processus de fabrication. *Penicillium* peut être ensemencé dans le lait ou pulvérisé sur le fromage après salage. L'espèce *Debaryomyces hansenii* est présente en forte proportion pour les activités « Fromage 1 soin 1 » et Fromage 2. La levure *Debaryomyces* compose à 42% la communauté fongique de l'activité « Fromage 1 soin 1 » alors qu'elle est présente à 0,6% pour l'activité « Fromage 1 soin 2 ». Cette levure est un agent d'affinage qui permet, entre autres, l'implantation d'autres microorganismes comme *Penicillium*. Ce résultat suggère que la maturation du Fromage 1 entraîne un changement de communauté fongique, la levure *Debaryomyces* laisse place au *Penicillium*.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2021-24828 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

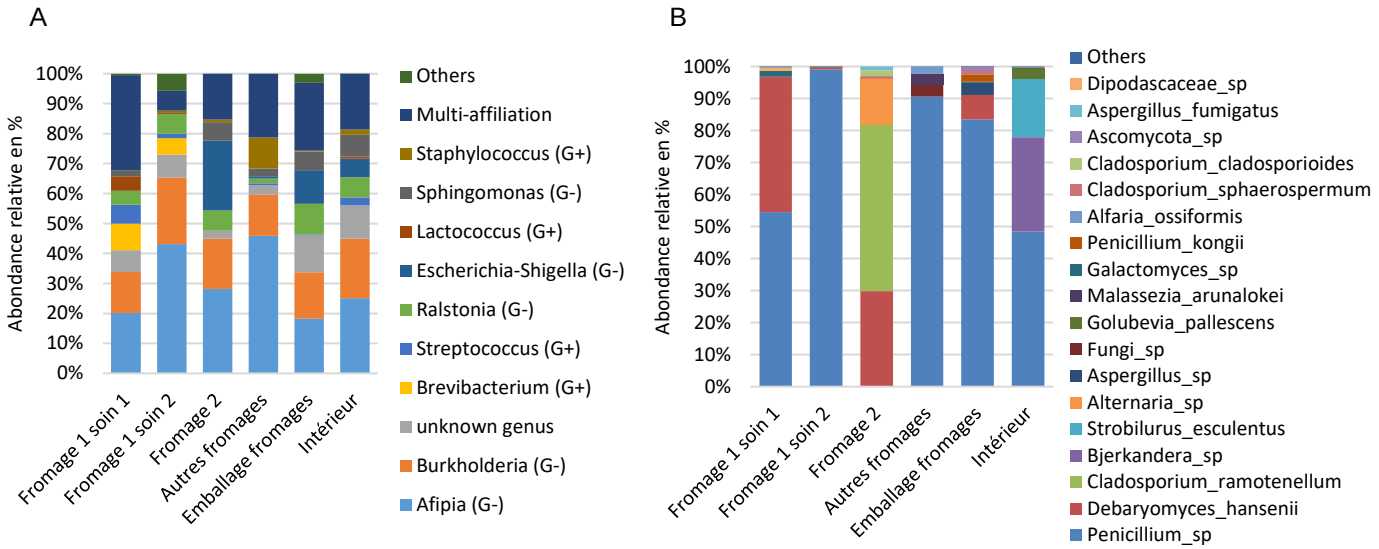

Figure 2. Composition en genres bactériens (A) et espèces fongiques (B) des bioaérosols en fonction de l'activité

CONCLUSION

L'abondance et la diversité de la communauté microbienne des bioaérosols de la fromagerie ont été étudiées de façon globale grâce à l'utilisation de la PCR quantitative et au séquençage haut débit. Le brossage, soin appliqué aux fromages, engendre des concentrations importantes de moisissures dans l'air. Par ailleurs, la composition de la communauté microbienne est fonction de l'activité. Des résultats équivalents ont été trouvés dans cette fromagerie (Duquenne *et al.*, 2020) et d'autres (Chaumont *et al.*, 2001), lors de mesures de concentration en moisissures cultivables. Les différentes activités de la fromagerie présentent donc des niveaux d'exposition aux bioaérosols différents. Sur la base de ces constats qui apportent un éclairage nouveau sur les situations de travail, des réflexions sont en cours pour étudier, avec l'entreprise et la CARSAT, la mise en place d'actions de prévention.

Duquenne, P., et al. (2020) Pollution atmosphérique par des agents chimiques et biologiques dans les locaux d'une entreprise fromagère, 34ème Congrès Français sur les Aérosols, Paris, 27-28 janvier 2021
Escudié, F., et al., (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution, Bioinformatics. 34, 287-1294
Chamberland, J., et al., (2017) Effect of membrane material chemistry and properties on biofouling susceptibility during milk and cheese whey ultrafiltration, J. Membr. Sci. 542, 208-216
Chaumont, J.P., et al. (2001) Moisissures et allergies des professions agricoles et de l'agroalimentaire. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. 41, 253-256.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2021-24828
Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs