

EVALUATION DE DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE GENERALISTES POUR LE DENOMBREMENT DES BIOAEROSOLS DANS L'AIR DES LIEUX DE TRAVAIL

L. Alonso¹, P. Loison¹, L. Albers¹, C. Coulais¹ et C. Dziurla¹

¹Laboratoire de Métrologie des Aérosols
INRS, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

*Courriel de l'orateur : lise.alonso@inrs.fr

EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR MEASUREMENT OF WORKPLACE BIOAEROSOLS

RESUME

Le dénombrement des bioaérosols sur milieux de culture est une méthode peu coûteuse, simple à mettre en place et qui fait toujours référence pour l'étude des bioaérosols dans l'air des lieux de travail. Pourtant, l'évolution des connaissances scientifiques et les retours d'expérience des utilisateurs indiquent que les milieux de culture utilisés ne sont pas toujours suffisamment sélectifs (des bactéries poussent sur un milieu destiné aux moisissures, par exemple). Ainsi, la croissance de différents micro-organismes en suspension liquide et après aérosolisation a été comparée au laboratoire sur plusieurs milieux de culture afin d'évaluer leur spécificité.

ABSTRACT

The enumeration of bioaerosols on culture media is a low-cost method that is easy to set up and is still the benchmark for studying bioaerosols in workplace air. However, developments in scientific knowledge and feedback from users indicate that the culture media used are not always sufficiently selective (e.g. bacteria grow on a medium intended for fungi). Therefore, the growth of different microorganisms in liquid suspension and after aerosolisation was compared in the laboratory on different culture media to assess their specificity.

MOTS-CLÉS: bioaérosols, quantification, milieux de culture/ **KEYWORDS:** bioaerosols, quantification, culture media

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Dans le cadre de l'évaluation des niveaux d'exposition professionnelle aux bioaérosols, la caractérisation par la quantification et/ou l'identification des champignons et bactéries aéroportés dans les ambiances professionnelles est essentielle. Après leur prélèvement, les bioaérosols peuvent être analysés par une méthode dite « culture-dépendante ». Elle repose sur la capacité des micro-organismes à se développer sur un ou plusieurs milieux de culture gélosés généralistes ou sélectifs. A l'INRS, basés sur la méthode MétroPol M-147 (MétroPol, 2014), les milieux de culture généralistes utilisés sont le tryptone soy agar (TSA) additionné d'un antifongique pour dénombrer les bactéries et le malt extract agar (MEA) pour dénombrer les moisissures. Néanmoins, ces milieux de culture ne sont pas suffisamment spécifiques. En effet, lors de prélèvements dans divers secteurs professionnels des bactéries se développent sur le milieu de culture dédié aux moisissures et inversement. De plus, cette méthode de mise en culture n'est pas harmonisée, la composition de la solution d'extraction, la température et la durée d'incubation varient entre les pratiques des différents instituts homologues et la norme NF EN 13098. L'objectif de ce travail est de proposer des milieux de culture généralistes mieux adaptés au dénombrement des micro-organismes rencontrés dans l'air des lieux de travail à des fins premières de caractérisation des expositions professionnelles. Pour cela, une analyse de la littérature (Simon, 2019) a été réalisée pour sélectionner les milieux de culture et les additifs (antifongiques ou antibiotiques) les plus pertinents. Ensuite, ces milieux de culture additionnés ou non ont été comparés pour évaluer l'impact des additifs sur la croissance de plusieurs micro-organismes (bactéries, moisissures, levures), dans un premier temps à partir de suspensions liquides puis à partir de bioaérosols.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Sélection des milieux de culture et additifs

L'analyse de 125 articles scientifiques a permis de sélectionner les 3 milieux de culture les plus utilisés pour le dénombrement des bactéries : le TSA, le Nutrient Agar (NA) et le Plate Count Agar (PCA), ainsi que le cycloheximide comme additif antifongique avec des concentrations variant de 50 à 500 mg/L. Quatre milieux de culture ont été identifiés après analyse de 167 articles pour le dénombrement des moisissures : le Malt Extract Agar (MEA), le Sabouraud Dextrose Agar (SDA), le Dycloran-glycerol (DG18) et le Rose Bengal chloramphenicol (RBC) ainsi que le chloramphénicol comme antibiotique avec des concentrations variant de 50 à 1000 mg/L. Les milieux TSA et MEA étant ceux actuellement utilisés au laboratoire, un autre fabricant

de ces deux milieux a été testé afin d'évaluer l'impact potentiel de la fabrication sur la croissance des micro-organismes.

2.2. Préparation des milieux de culture sur boîtes de Petri

Une quantité de poudre définie selon le milieu à préparer est ajoutée à un litre d'eau purifiée. Après dissolution complète, le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 15 min à 121°C. Une fois refroidi à 55°C, l'additif avec une concentration définie peut être ajouté au milieu de culture. L'ensemble est homogénéisé puis réparti dans des boîtes de Petri.

2.3. Sélection des micro-organismes

Huit micro-organismes ont été sélectionnés pour comparer les milieux de culture, les bactéries à Gram négatif *Serratia marcescens* et *Klebsiella sp.*, les bactéries à Gram positif *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus epidermidis*, les actinobactéries *Streptomyces albus* et *Streptomyces sp.*, les moisissures *Penicillium chrysogenum* et *Aspergillus fumigatus*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et une levure issue d'un prélèvement d'air en milieu agricole non identifiée. Pour chaque type de micro-organisme, une souche de référence et une souche de terrain ont été choisies car les souches issues de collection de référence sont considérées comme étant plus sensibles aux stress environnementaux que les souches environnementales. Pour ce résumé, seuls les essais concernant les deux souches bactériennes à Gram négatif *Serratia marcescens* et *Klebsiella sp.* sont présentés.

2.4. Préparation des suspensions bactériennes

Une suspension de *Serratia marcescens* provenant d'une collection de souches de référence et une suspension de *Klebsiella sp.* provenant d'un prélèvement dans une ferme sont préparées à partir d'une pré-culture. Après lavage, les suspensions sont ajustées à une DO_{600nm} de 1 afin de les standardiser. Les suspensions sont diluées en série au dixième jusqu'à 10^{-6} pour obtenir un nombre de colonies permettant un dénombrement correspondant aux bornes de comptage (15 à 300 colonies). Enfin, des volumes de 100 μ l de suspension sont étalés sur les 8 conditions de milieux de culture.

Pour chaque milieu de culture, 10 boîtes de Petri sont étalées avec un râteau. Les boîtes sont incubées à 37°C pour *Klebsiella sp.* et à 30°C pour *Serratia marcescens* pendant 24h. Le dénombrement est réalisé à l'aide d'un compteur de colonies.

2.5. Analyses statistiques

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée pour comparer les différentes conditions et complétée par un test de Tukey qui permet d'identifier les différences par paire.

3. RESULTATS : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ANTIFONGIQUE SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE

La croissance de *Klebsiella sp.* et de *Serratia marcescens* a été comparée sur les milieux de culture sans et avec cycloheximide (250 mg/L) (Figure 1). La quantification de *Klebsiella sp.* varie en fonction des milieux de culture sans cycloheximide sauf entre le milieu TSA BD et le milieu TSA BK, la plus forte concentration est retrouvée sur le milieu PCA. Pour les milieux contenant 250 mg/L de cycloheximide, la concentration en *Klebsiella sp.* est statistiquement la même entre le TSA BD et le milieu NA BK et entre le milieu TSA BK et PCA BK. La concentration la plus élevée est celle sur le milieu PCA. De manière étonnante, la présence de cycloheximide à 250 mg/L dans le milieu TSA BK entraîne une plus forte concentration de bactérie alors que dans les milieux NA BK et PCA BK, la croissance semble être affectée.

Concernant *S. marcescens*, la quantification est différente en fonction des milieux de culture sans cycloheximide avec une plus forte croissance sur le milieu TSA BD. La présence de cycloheximide à 250 mg/L dans les milieux TSA BD et TSA BK impacte la croissance de *S. marcescens*. Sur le milieu TSA BD, le cycloheximide entraîne une diminution de la croissance alors que sur le milieu TSA BK la croissance est plus importante. En revanche, la présence de cycloheximide n'impacte pas la croissance de *S. marcescens* sur les milieux NA et PCA.

Ces résultats indiquent que la croissance des bactéries est influencée par le milieu de culture et par la concentration en cycloheximide, additif ciblé comme antifongique.

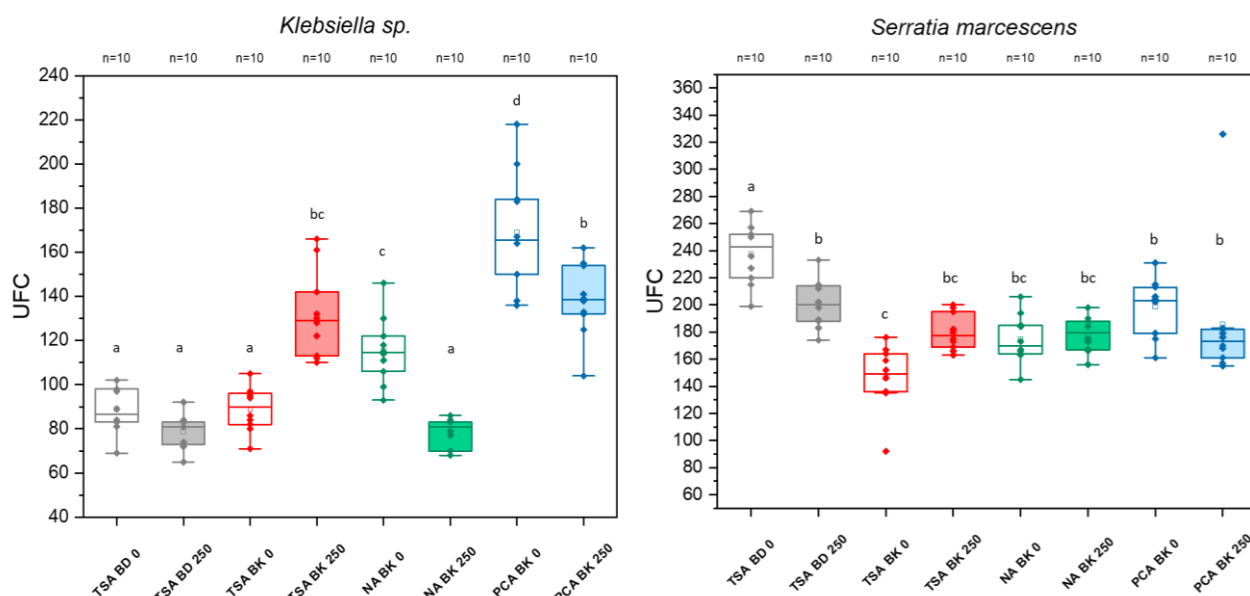


Figure 1. Nombre d'unité formant colonies (UFC) de *Klebsiella sp.* et *Serratia marcescens* en fonction des milieux de culture et de la concentration en cycloheximide (0 mg/L boîtes à moustache sans remplissage ou 250 mg/L avec remplissage).

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'influence de différents milieux de culture additionnés ou non d'antifongique a été évalué sur la croissance de deux bactéries à Gram – à partir d'une suspension liquide. Bien que les résultats indiquent une différence de croissance en fonction du milieu et de la concentration en cycloheximide, ce même travail doit être réalisé à partir de micro-organismes aérosolisés. Les premières expériences de génération (non présentées) ont permis de montrer une meilleure survie des bactéries lorsqu'elles sont prélevées à l'aide d'un BioSampler (impaction en voie liquide) plutôt qu'avec la cassette fermée 3 pièces 37mm (filtration). Ces travaux vont se poursuivre en continuant à comparer les différents milieux de culture à partir de bioaérosols simples puis en mélange. Ensuite, des prélèvements dans différents secteurs d'activité (compostage, tissage de fibres, station d'épuration) permettront de valider les données obtenues au laboratoire. L'ensemble de ce travail conduira à proposer un choix de milieux de culture plus appropriés à l'évaluation des expositions professionnelles.

MétroPol (2014). "Méthode M-147 - Microorganismes aérobies." from http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_147.

AFNOR. NF EN 13098 - Exposition sur les lieux de travail — Mesurage des micro-organismes et des composés microbiens en suspension dans l'air — Exigences générales. Septembre 2019.

Simon X, Loison P. (2019) Airborne Fungi in Workplace Atmospheres: Overview of Active Sampling and Offline Analysis Methods Used in 2009–2019 Reference Module in Life Sciences 2020