

# ETUDE DE LA SURVIE DES MICROORGANISMES COLLECTES PAR DES FILTRES DE CENTRALES DE TRAITEMENT D'AIR

D. Deshayes<sup>\*1,2</sup>, P. Le Cann<sup>2</sup>, Y. Andrès<sup>1</sup> et A. Joubert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IMT Atlantique, GEPEA, CNRS UMR 6144, 44300 Nantes, France

<sup>2</sup>Ecole de Hautes Etudes en Santé Publique– UMR-S 1085, 35000 Rennes, France

\*Courriel de l'orateur : delphine.deshayes@imt-atlantique.fr

## TITLE

**Study of microorganisms' survival collected by Air Handling Units filters**

## RESUME

L'échantillonnage des aérosols microbiens peut-être difficile dans l'air en raison de leur faible concentration. Les filtres de centrales de traitement d'air (CTA), qui accumulent ces bioaérosols du fait des grands volumes d'air traités, représentent une alternative pour l'étude du microbiote aérien des bâtiments. Cependant, la survie des microorganismes sur ces filtres reste mal comprise. Cette étude propose d'analyser la viabilité au sein d'une communauté microbienne sur un filtre de CTA en présence d'une poussière modèle (poudre d'amidon de maïs). Pendant un an et en conditions réalistes (modèle de CTA à échelle 1), la survie et l'évolution de trois microorganismes modèles ont été suivies : *Aspergillus niger* (spores), *Bacillus subtilis* (sous forme sporulée) et *Staphylococcus epidermidis* (sous forme végétative), en utilisant la culture sur milieu gélosé et des méthodes de biologie moléculaire.

Les résultats montrent que les microorganismes sporulés s'accumulent et sont capables de croître sur le filtre, même lorsqu'ils sont exposés à une vitesse d'air élevée. Cette croissance est concomitante à une augmentation de la teneur en eau du filtre et du gâteau de filtration et est suivie d'une phase de mortalité (diminution des dénombrements par culture). En revanche, les microorganismes sous forme végétative sont rapidement lysés et leur ADN dégradé. En conclusion, la croissance microbienne est possible à la surface des filtres de CTA et dépend fortement de la quantité d'eau disponible ainsi que de la nature des microorganismes. L'identification des microorganismes dans les échantillons de filtre, qu'elle soit par culture ou par biologie moléculaire, est donc fortement influencée par la nature des microorganismes, ainsi que l'humidité et la température dans la CTA.

## ABSTRACT

Sampling microbial aerosols may be difficult due to their low concentration. Air handling unit (AHU) filters, which accumulate these bioaerosols with large volumes of treated air, represent an alternative for studying the airborne microbiota in buildings. However, the survival of microorganisms on these filters remains poorly understood. This study proposes to analyze the viability within a microbial community on an AHU filter in the presence of model dust (corn starch powder). During a one-year study and under real-world conditions (full-scale AHU model), the survival and evolution of three model microorganisms were monitored: *Aspergillus niger* (spores), *Bacillus subtilis* (in spore form), and *Staphylococcus epidermidis* (in vegetative form), using agar culture and molecular biology methods. The results show that spore-forming microorganisms accumulate and are able to grow on the filter, even when exposed to high air velocity. This growth is accompanied by an increase in the water content of the filter and is followed by a mortality phase (decrease in culture counts). The microorganisms in vegetative form are rapidly lysed and their DNA degraded. In conclusion, microbial growth is possible on the surface of AHU filters and depends heavily on the amount of water available and the nature of the microorganisms. The identification of microorganisms in filter samples, by culture or molecular biology, is strongly influenced by the nature of the microorganisms, as well as the humidity and temperature in the AHU.

**MOTS-CLES** : aérosols microbiens, HVAC, filtre, suivi sur un an / **KEYWORDS**: airborne microorganisms, HVAC filter, one-year study

## 1. INTRODUCTION

Les méthodes traditionnelles d'échantillonnage de l'air (impaction sur gélose, transfert en phase liquide, filtration) présentent des limites liées au temps de prélèvement, aux faibles concentrations en microorganismes dans l'air, à leur potentielle altération due au stress de l'échantillonnage, et à la complexité des analyses post prélèvement (culture vs. biologie moléculaire). Pour pallier ces contraintes, le prélèvement direct sur les filtres de centrales de traitement d'air (CTA) permet de récupérer une quantité de matériel biologique plus importante, offrant un substrat d'étude idéal de la microflore aérienne accumulée au cours du temps. Des recherches précédentes ont ainsi permis la mise au point d'une méthode de prélèvement à la surface des filtres de CTA à l'aide de morceaux de filtres (coupons) fixés à la surface des filtres (Deshayes, 2024). L'analyse de ces coupons fixés sur un filtre traitant l'air de bureaux a permis d'étudier le microbiote aérien d'un bâtiment et son évolution sur une année par séquençage ADN Illumina 16S et ITS. L'objectif de la présente étude est de mieux comprendre la survie des microorganismes collectés sur ce type de filtre. En effet, ce dernier n'est pas inerte : il est le siège de divers phénomènes influencés par les conditions opératoires

(humidité, température, particules déposées, temps de fonctionnement et d'arrêt...), allant de la mort cellulaire à la stase ou au développement/croissance (Gonzalez H., 2014). C'est cette activité microbienne complexe (mort, stase, développement) sur les filtres de CTA qui constitue l'objet de l'étude.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Dispositif expérimental

Les essais ont été réalisés dans un modèle de CTA à échelle 1, conçu autour d'un tunnel de ventilation de section 590x590 mm. Le banc a fonctionné à un débit d'air constant de 1700 m<sup>3</sup>/h (débit nominal du filtre). Les variations de température, d'humidité et de perte de charge du filtre ont été enregistrées en continu. En complément des aérosols microbiens générés dans le banc d'essai, de la poudre d'amidon de maïs (poudre Holi) a été générée chaque semaine avec un générateur à anneau (TSI Dust Aerosol Generator 3410). Cette poudre représente la fraction organique de la poussière susceptible de substrat aux microorganismes. Elle est générée de manière à obtenir, en fin d'essai, une perte de charge du filtre égale à 1,5 fois la perte de charge initiale avec le filtre vierge.

Le filtre étudié était un filtre à poche Camfil de classification ePM1 50% (selon ISO 16890). Des disques (ou coupons) de média filtrant, de nature strictement identique au support, ont été fixés sur le filtre à l'aide d'agrafes chirurgicales stériles. Ces coupons de 22mm ont servi de points d'échantillonnage pour le suivi de l'accumulation microbienne au cours du temps sans compromettre l'intégrité globale du filtre.

### 2.2. Génération et quantification des suspensions microbiennes

Les microorganismes ont été générés dans le banc d'essai une fois par semaine. Les souches utilisées comprenaient *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* sous forme sporulé, et les spores d'*Aspergillus niger*. Les suspensions générées présentaient des concentrations approximant 10<sup>7</sup> UFC/mL pour chaque souche.

L'aérosolisation des bactéries en suspension dans un tampon (NaCl 9‰) a été effectuée à l'aide d'un générateur d'aérosols PLG 2000 Palas pendant les quatre premiers mois, puis un AGK 2000 Palas équipé d'une colonne de séchage des gouttelettes. Les spores d'*Aspergillus niger* ont été aérosolisées par AGK 2000 Palas tout au long des essais. Les spores d'*A. niger* étaient en suspension dans un mélange équivalent de tampon physiologique (NaCl 9‰) et de tampon MgSO<sub>4</sub> (0.25%) + Tween20 (0.25%) afin d'éviter la formation d'agrégats du fait de leur nature hydrophobe. Chaque génération a eu lieu sur une durée de 2h.

Pour déterminer l'Unité Formant Colonie (UFC) totale théorique déposée sur le filtre, la concentration d'aérosol généré en amont du filtre a été systématiquement contrôlée par impaction avec un échantillonneur Andersen 6 étages, fonctionnant à un débit de 28,3 L/min. Les impactions ont été réalisées sur gélose nutritive supplémentée en natamycine (32,45 µM) pour les bactéries et sur milieu dichloran rose bengal chloramphénicol (DRBC) pour les champignons. Le nombre d'UFC total déposé à la surface du filtre a ensuite été calculé (Équation 1), en faisant l'hypothèse que le filtre (de classe ePM1 60%) a une efficacité de 100% pour les aérosols microbiens, leurs diamètres étant strictement supérieurs à 1µm.

$$P_{cumulée} = \frac{T \times (\sum_{i=1}^N D_i) \times Q}{S \times 1000}$$

P<sub>cumulée</sub> : particules/cm<sup>2</sup>

T : temps de génération (2h)

D<sub>i</sub> : concentrations en particules mesurées à chaque N génération

Q : débit du banc (1700m<sup>3</sup>/h)

S : surface filtrante (1,3m<sup>2</sup>)

Équation 1: Calcul du nombre d'UFC total déposé à la surface du filtre

### 2.3. Protocoles de prélèvements et d'analyse

Trois coupons ont été prélevés chaque mois pour l'analyse des microorganismes viables. L'extraction des microorganismes a été réalisée dans 3mL d'un tampon MgSO<sub>4</sub> + Tween20 sous agitation pendant 1h. L'extrait a ensuite été utilisé pour une analyse par culture sur milieux gélosés (gélose nutritive + natamycine et DRBC) et par viability PCR (traitement des échantillons au propidium monoazide).

Trois autres coupons ont été prélevés pour l'analyse de la charge génomique totale. L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide du kit PowerWater (QIAGEN) en déposant directement un coupon dans un tube d'extraction ADN. La quantification des microorganismes a été réalisée par qPCR avec sonde Taqman.

Les quantités de microorganismes dénombrées par culture et qPCR sont rapportées à la quantité théorique cumulée collectée par le filtre ( $P_{cumulée}$ ) pour calculer la fraction de la charge microbienne totale identifiée (FCMTI) par culture et par qPCR.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure 1 présente les résultats obtenus après 8 mois de suivi pour *B. subtilis* et *A. niger*. En effet, dans le cas de *S. epidermidis* aucune bactérie viable cultivable n'a été retrouvée.

Pour les mois de février, mars, juin, juillet et septembre, la fraction de la charge microbienne totale identifiée (FCMTI) par culture pour *Bacillus subtilis* atteint en moyenne 63% ( $\pm 7$ ), contre 39% ( $\pm 7$ ) par qPCR (Figure 1). En revanche, durant les mois d'avril, mai et août, les valeurs obtenues par qPCR excèdent les quantités théoriquement déposées sur le filtre, atteignant respectivement 380% ( $\pm 210$ ), 156% ( $\pm 85$ ) et 123% ( $\pm 13$ ). Un comportement comparable est observé pour *Aspergillus niger* en avril, mai, juin, août et septembre, avec des FCMTI par qPCR respectives de 300% ( $\pm 84$ ), 109% ( $\pm 18$ ), 165% ( $\pm 19$ ), 241% ( $\pm 86$ ) et 183% ( $\pm 89$ ). Sur les autres périodes, la qPCR fournit des résultats différents, avec un taux moyen de 72% ( $\pm 24$ ), supérieur à celui obtenu par culture (40%  $\pm 7$ ).

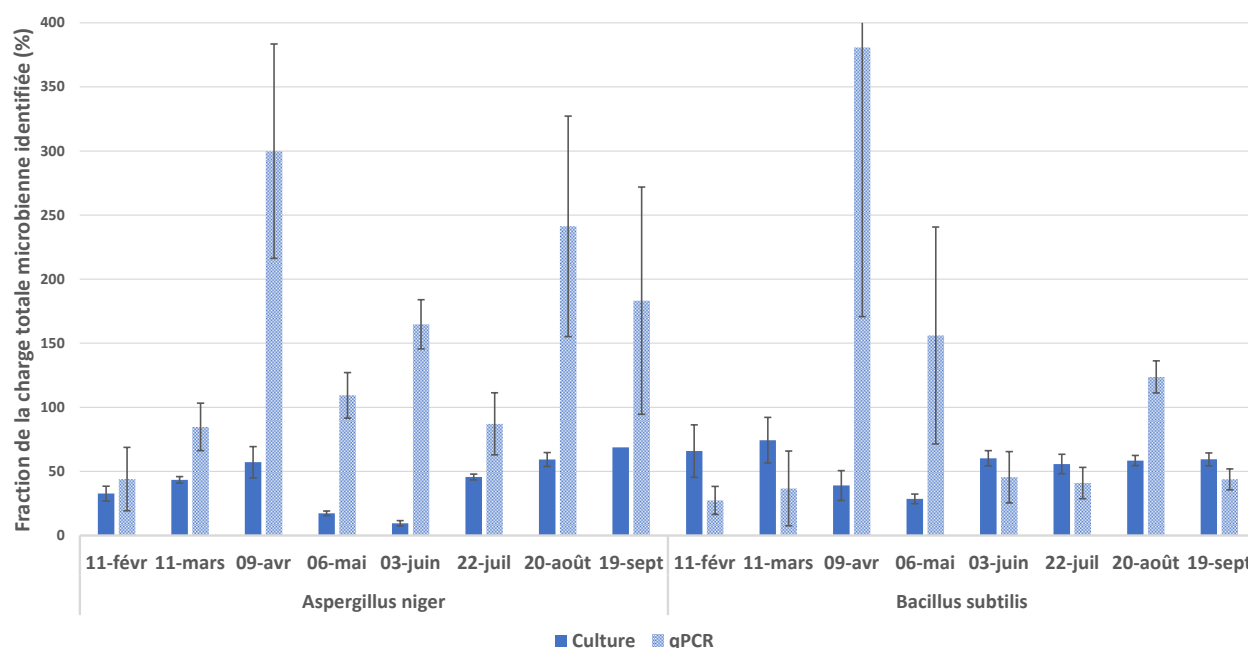


Figure 1: Evolution de la fraction microbienne identifiée à la surface du filtre par culture et qPCR pour *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis* à l'aide des coupons (moyenne N=3)

Pour ces deux microorganismes, la forte augmentation du signal détecté par qPCR s'accompagne d'une diminution des quantités récupérées par culture, atteignant un minimum de 9% pour *A. niger* en juin et de 28% pour *B. subtilis* en mai. L'évolution des courbes obtenues par qPCR suivent étroitement celle de la teneur en eau des filtres, avec des dépassements de 100% lorsque la quantité d'eau adsorbée sur le filtre augmente (Figure 2). Un maximum est observé en avril, avec 0.69  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  d'eau présente sur le filtre, contre une moyenne globale de 0.39  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  ( $\pm 0.15$ ). Cette corrélation suggère que la disponibilité accrue en eau favorise une croissance microbienne sur le filtre, malgré le débit d'air élevé imposé dans le banc d'essai pouvant induire un stress sur les microorganismes.

L'augmentation de la quantité d'eau en avril est potentiellement liée à l'absence de colonne de séchage jusqu'en mai lors de la génération des aérosols. La prolifération microbienne, détectée par qPCR, correspond vraisemblablement à une reprise d'activité métabolique des formes sporulées de *Bacillus* et *Aspergillus*, induisant une multiplication mais aussi une transition vers des formes végétatives qui sont sensibles aux stress. Ce phénomène s'accompagne donc d'une mortalité accrue sur le filtre, qui se traduit par la diminution des colonies viables observées en culture et confirmée par les tests de viabilité PCR. Ainsi, les fluctuations

des FCMTI entre méthodes reflètent à la fois la croissance et la mortalité microbienne liées aux conditions micro-environnementales du filtre.

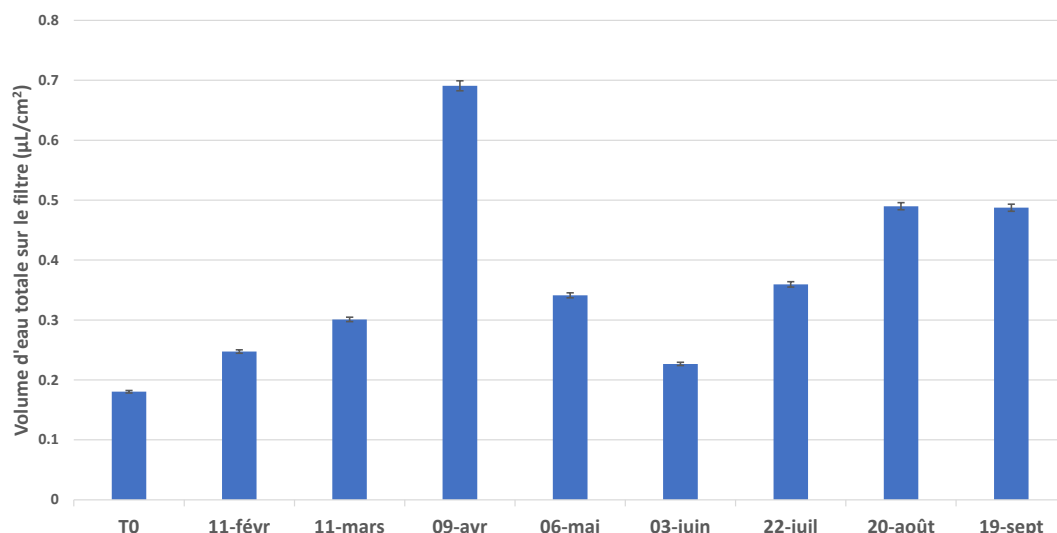


Figure 2: Teneur en eau du filtre déterminée par Karl Fisher à l'aide des coupons

Concernant *Staphylococcus epidermidis*, la qPCR permet toutefois sa détection, mais avec des taux de rétention très faibles au cours des six premiers mois d'expérimentation ( $4\% \pm 4$ ). Cette bactérie, exclusivement sous forme végétative, semble particulièrement sensible aux stress occasionnés par la génération, par la collecte sur le filtre et aux conditions expérimentales du banc d'essai. Elle est vraisemblablement rapidement lysée puis dégradée, limitant la quantité d'ADN exploitable pour l'analyse moléculaire. Cette hypothèse est appuyée par les résultats de viability PCR, qui confirment la faible viabilité de *S. epidermidis* sur le filtre.

Ces résultats mettent en évidence le rôle clé de l'humidité dans la survie microbienne à la surface des filtres de CTA. L'augmentation de la FCMTI mesurée par qPCR, notamment lors des augmentations de la teneur en eau du média filtrant, suggère une reprise d'activité métabolique ou une germination des spores de *Bacillus subtilis* et *Aspergillus niger*, suivie d'une mortalité accrue observable par culture. Cela confirme que l'activité microbienne sur le filtre ne se limite pas à un simple dépôt passif, mais résulte d'interactions complexes entre les conditions environnementales, la physiologie microbienne et les caractéristiques du support de filtration. Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives. Il serait notamment pertinent d'examiner plus finement les seuils d'humidité et de température favorisant la germination ou la croissance sur les filtres, ainsi que la cinétique de mortalité associée. Une telle approche permettrait de mieux comprendre la survie et la résilience microbienne dans de tels dispositifs de filtration d'air, mais aussi de mettre en perspective les résultats obtenus lors d'analyse du microbiote aérien des bâtiments suite à l'étude par culture ou biologie moléculaire des microorganismes prélevés sur les filtres.

Deshayes, D., Pavard, G., Joubert, A., Andrés, Y., Gerard, A., Le Cann, P. (2024) Development of a methodology for studying microbiological contamination of office indoor air by analyzing air handling unit filters - Application to a low-energy building, Journal of Building Engineering.

Gonzalez H., L F. (2014) Influence de la gestion des centrales de traitement d'air des réseaux de ventilation de bâtiments sur le développement d'aérosols microbiens, Université Nantes Angers Le Mans.