

COMPARAISON DES PERFORMANCES EN LABORATOIRE DE DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE POUR LE DENOMBREMENT DES BIOAÉROSOLS DANS L'AIR DES LIEUX DE TRAVAIL

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

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

*Courriel de l'orateur : pauline.loison@inrs.fr

TITLE

LABORATORY PERFORMANCE COMPARISON OF DIFFERENT CULTURE MEDIA FOR QUANTIFICATION OF BIOAEROSOLS IN WORKPLACE AIR

ABSTRACT

Quantification of bioaerosols on culture media is an inexpensive method that is easy to implement and remains the gold standard for studying bioaerosols in workplace air. Various observations (changes in standards, media that are not sufficiently selective, differences in practices between laboratories, etc.) have led to study of the performance of different culture media for the quantification of airborne culturable microorganisms. To this end, comparative laboratory tests led on different aerosolized microorganisms have been conducted.

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. Différents constats (modifications normatives, milieux qui ne sont pas suffisamment sélectifs, différences de pratiques entre laboratoires, etc.) ont conduit à étudier les performances de différents milieux de cultures pour le dénombrement des micro-organismes cultivables aéroportés. Pour cela, des essais de comparaisons en laboratoire sur différents micro-organismes aérosolisés ont été menés.

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

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

L'évaluation des expositions aux agents chimiques et biologiques par une approche métrologique peut apporter des informations utiles pour la prévention en permettant par exemple d'objectiver et de hiérarchiser les risques ou encore de dimensionner ou vérifier l'efficacité des moyens de prévention mis en place. Concernant les aérosols biologiques, les travaux de recherche menés depuis plusieurs années par l'INRS ont permis de mettre à disposition certaines méthodes via notamment la base de données MétroPol : microorganismes cultivables, endotoxines et plusieurs mycotoxines. Ces méthodes ont été développées dans un objectif d'harmonisation des pratiques et afin que l'interprétation des résultats des mesures soient homogènes et comparables (Loison et al., 2024). Les données obtenues lors d'études de terrain alimentent notamment la base de données Colchic d'exposition professionnelle aux agents chimiques et biologiques qui, à ce jour, contient environ 13000 résultats de mesures de bioaérosols (période 2008-2024). Concernant les bioaérosols, il s'agit majoritairement de résultats de mesures des microorganismes cultivables mésophiles (66%) (cultivables à 25°) ainsi que d'endotoxines (22%). Bien que l'impact des bioaérosols sur la santé est reconnu, il n'existe pas au niveau international ou en France de valeurs limites d'exposition professionnelle pour les bioaérosols. Face à ce manque, des valeurs guides de prévention, basées sur l'exploitation des résultats de mesures d'expositions professionnelles enregistrés dans la base Colchic ont été établies pour les bactéries et moisissures cultivables ainsi que pour les endotoxines. Plusieurs études précédentes menées au laboratoire de Métrologie des Aérosols (MA) ont conduit au développement d'une méthode de mesure des microorganismes cultivables. Ce travail a abouti à la création en 2014 de la fiche MétroPol M-147 « Microorganismes aérobies » (MétroPol, 2015) qui décrit le prélèvement d'échantillons de bioaérosols et leur analyse par culture. Cette méthode se décompose en deux parties principales :

1. Le prélèvement en mode actif des bioaérosols sur cassette fermée à un débit de 2 L/min
2. L'analyse par comptage des microorganismes aérobies

Suite à différents constats (retours d'expérience sur des problèmes de sélectivité des milieux, différences de pratique entre instituts, modifications de la norme NF EN 13098) et dans une démarche d'amélioration continue des pratiques, un travail d'optimisation de cette méthode a été initié en 2022. En effet, malgré l'essor des méthodes moléculaires, la méthode par culture fait toujours référence et est encore largement déployée pour la quantification des bioaérosols (Simon et Loison, 2021). L'objectif principal 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. Ce travail porte principalement sur la partie analytique de la méthode.

La première partie de ce projet a consisté à faire une revue de la littérature afin d'identifier les différents milieux de cultures (ainsi que les concentrations en antibiotiques et antifongiques qui leurs sont associés) les plus couramment utilisés pour le dénombrement des microorganismes cultivables issus de prélèvement d'air. Ces milieux de culture ont ensuite été comparés sur des bioaérosols modèles de laboratoire afin de répondre à ces questions : Un milieu permet-il une quantification plus élevée que les autres ? Quelle est la concentration optimale en antibiotique ou antifongique ? Cette concentration a-t-elle un effet sur la croissance et/ou la quantification des micro-organismes non cibles ? Observe-t-on une amélioration de la quantification lorsque l'on diminue le volume de récupération utilisé pour extraire les microorganismes de la cassette de prélèvement ?

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Milieux de cultures et additifs comparés

Le dénombrement des bactéries a été comparé sur 3 milieux de cultures : le Tryptic Soy Agar (TSA), le Nutrient Agar (NA) et le Plate Count Agar (PCA), additionnés ou non de cycloheximide (un antibiotique) aux concentrations de 80, 100 ou 250 mg/L. La quantification des moisissures a été comparées sur 4 milieux de culture: le Malt Extract Agar (MEA), le Sabouraud Dextrose Agar (SDA), le Dycloran-glycerol (DG18) et le Rose Bengal chloramphenicol (RBC), additionnés ou non de chloramphénicol (un antifongique) aux concentrations de 50, 100 ou 1000 mg/L. Le milieu TSA additionné de 80 mg/L de cycloheximide ainsi que le MEA sont les milieux proposés actuellement dans la méthode Métropol M-147. Ainsi, aucun antibiotique n'était utilisé pour s'affranchir des bactéries dans les milieux utilisés pour le dénombrement des moisissures. De plus, ces deux milieux faisant office de référence, il a été choisi de comparer ces mêmes formulations mais provenant d'un autre fabricant afin d'évaluer l'impact potentiel de la fabrication sur la croissance des micro-organismes.

2.2 Microorganismes d'essai

Bactéries :

La comparaison des milieux a été réalisée à partir de bactéries issues de collection de référence ainsi qu'obtenues lors de prélèvements antérieurs en atmosphère professionnelle. Ainsi les bactéries *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus atrophaeus* (souches de références) ainsi que les souches sauvages *Streptomyces sp.* et *Klesbiella sp.* ont été testées. Globalement, la préparation des suspensions bactériennes étaient standardisées de la manière suivante : des cultures en milieu TSB étaient réalisées sur la nuit à leur température de croissance puis lavées 3 fois avec du PBS par centrifugation et enfin la DO_{600nm} de la suspension était ajustée à 1. Cette standardisation permet d'obtenir des suspensions homogènes et reproductibles pour les différentes générations. Le protocole pour l'actinomycète était différent (présence de pellets et durée de croissance de 7 jours).

Moisissures et levures :

La moisissure *Penicillium chrysogenum* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (souches de référence) ainsi que la moisissure *Aspergillus fumigatus*, et une levure issue d'un prélèvement d'air en milieu agricole non identifiée ont été utilisés pour tester les milieux de culture généralistes choisis pour les espèces fongiques. Seules les moisissures ont pu être générées, aucune levure n'ayant pu être cultivées après aérosolisation. Afin de produire des suspensions de spores fongiques, celles-ci étaient cultivées pendant 3 semaines sur milieu MEA, puis les spores étaient récoltées par grattage. Les suspensions sont ensuite standardisées par pesée d'une quantité similaire de spores, remise en suspension dans du PBS et filtrées à l'aide d'une seringue et de la laine de verre. La préparation des levures étaient standardisées par une méthode similaire à celle des bactéries avec une culture en milieu liquide Sabouraux et une croissance d'environ 72h.

Afin d'évaluer l'efficacité des antibiotiques et antifongiques, des suspensions en mélange de la bactérie *S. marcescens* et de la moisissure *P. chrysogenum* ont également été réalisées.

2.3 Génération des bioaérosols

Les bioaérosols ont été générés dans le banc d'essai GenBio (Figure 1) précédemment décrit (Loison *et al.*, 2025). Les suspensions fraîchement préparées le jour de la génération ont été utilisées pour aérosoliser les micro-organismes. Pour chaque micro-organisme au moins deux générations indépendantes ont été réalisées. Au total, 11 générations de bactéries et 6 générations de moisissures ont été effectuées.

Après une période de stabilisation d'environ 20 min, les prélèvements des bioaérosols ont été réalisés pendant 60 min à l'aide de cassettes fermées 37 mm équipées d'une membrane en polycarbonate et d'un pad support

à un débit de 2 L/min [3]. La stabilité de l'aérosol a été suivie à l'aide d'un compteur optique de particules (TSI OPS 3330) utilisé également pour cibler une concentration entre ~ 1500 et 2500 particules/cm³ (variable selon les microorganismes générés). Quelques exemples de suivi OPS sont donnés en Figure 1. Après chaque génération, les cassettes prélevées sont éluées avec 5 ou 10 mL d'une solution saline d'extraction puis diluées en série au dixième pour obtenir un nombre de colonies permettant un dénombrement. Enfin, des volumes de 100 µl de suspension sont étalés sur 2 à 3 boîtes des dilutions choisies et ce pour chaque condition (15 milieux pour les bactéries et 16 pour les moisissures).

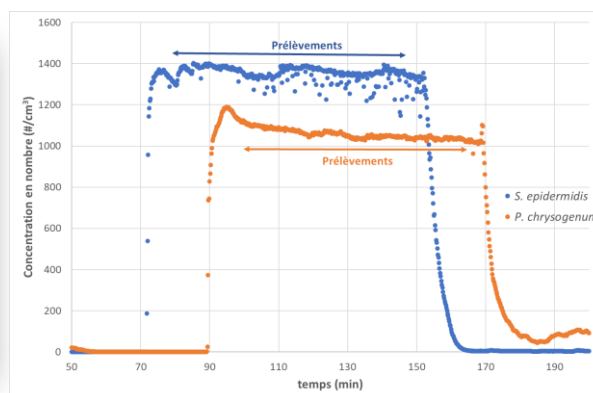


Figure 1 : banc d'essai utilisé (à gauche) et exemples de suivi de la concentration en nombre de particules/cm³ obtenus à l'aide d'un compteur optique de particules OPS 3330 (à droite).

3. RESULTATS PRINCIPAUX - DISCUSSION

3.1. Comparaison des dénombrements obtenus selon les milieux de culture

Les résultats de dénombrement obtenus après aérosolisation en fonction des différents milieux de culture sont présentés en Figure 2. Pour chaque micro-organisme cité, les valeurs représentées correspondent à la moyenne d'au moins deux répétitions de génération indépendantes. Les boîtes à moustache représentent quant à elles l'analyse de l'ensemble des données de génération obtenues par milieu toutes bactéries (Figure 2a) ou toutes moisissures (Figure 2b) confondues.

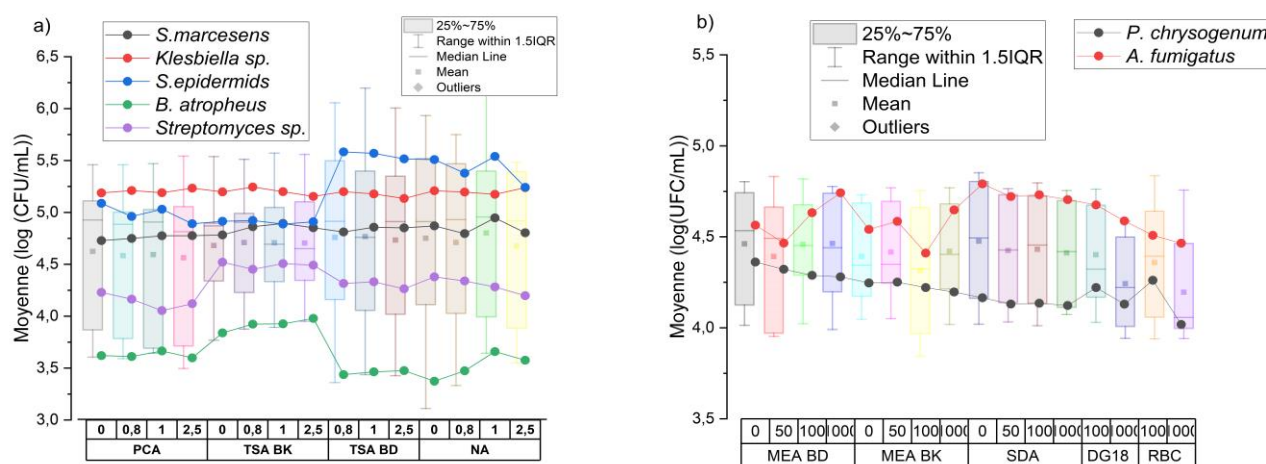


Figure 2 : Comparaison des quantifications obtenues selon les différents milieux de culture dédiés (a) aux bactéries et (b) aux moisissures. Pour chaque micro-organisme cité, les symboles ronds représentent les concentrations moyennes obtenues pour chaque milieu et pour au moins deux générations indépendantes. Les boîtes à moustaches représentent les analyses statistiques réalisées sur l'ensemble des données de générations (11 générations pour les bactéries et 6 générations pour les moisissures).

Ainsi, pour les bactéries, l'analyse statistique par ANOVA réalisée sur l'ensemble des données recueillies au cours des 11 générations ne révèle aucune différence significative entre les différents milieux. Pour autant, certaines bactéries (*Streptomyces sp.* ou encore *B. atropheus*) montrent une tendance pour laquelle le milieu TSA, notamment le TSA BK, serait à l'origine d'une quantification plus importante. La concentration en antibiotique ne semble pas impacter les espèces non ciblées du point de vue de la quantification mais modifie la taille de certaines colonies à haute concentration (résultats non montrés). De manière similaire à ce qui est obtenue pour les bactéries, aucune différence significative n'est observée concernant les milieux dédiés à la quantification des moisissures. Une tendance pour laquelle les milieux RBC et DG18 induirait une

quantification plus faible lorsque la concentration en antibiotique est de 1000 mg/L semble toutefois être observée.

3.2 Etude de l'influence de la concentration en antibiotique et antifongique

Afin d'étudier l'impact de différentes concentrations en anti-microbien, des mélanges de la bactérie *S. marcescens* et de la moisissure *P. chrysogenum* en différentes proportions dans l'aérosol ont été réalisés (ratio 5 :1 ; ratio ~1 :1 et ratio ~ 0,05 :1, correspondant aux Figure 3a, 3b et 3c).

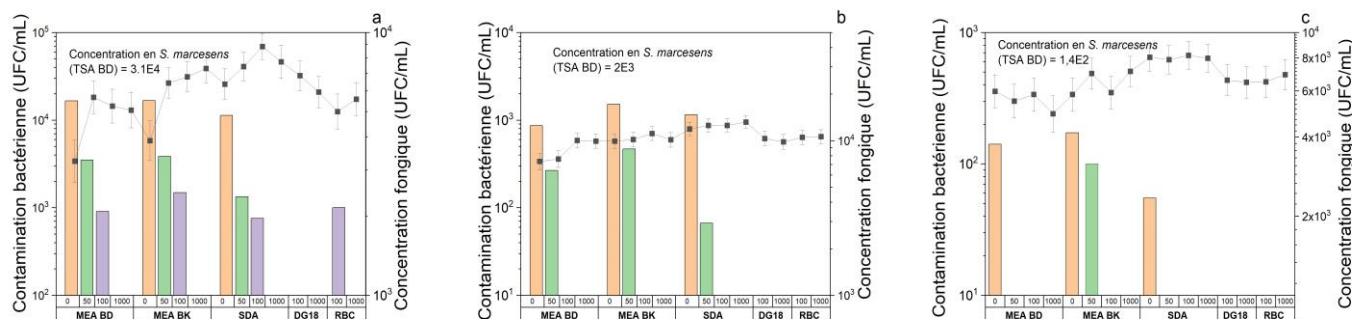


Figure 3 : Influence de la concentration en antibiotique sur la présence de bactéries sur les milieux dédiés à la quantification fongique. Les barres représentent les contaminations bactériennes alors que les symboles carrés représentent la concentration en moisissure. Différentes proportions de bactéries et moisissures ont été obtenues dans l'aérosol : ~ 5 :1 (a) ; ~ 1 :1 (b) et ~ 0,05 : 1 (c).

Ces essais permettent de constater que lorsque la concentration en bactéries est environ 5 fois plus importante que la concentration en moisissures, la quantification est biaisée, notamment pour les milieux MEA sans aucun ajout d'antibiotique (Figure 3a). L'ensemble des données permet également de constater que pour s'affranchir de toute présence de colonies bactériennes sur les milieux fongiques, une concentration de 100 mg/L, voire de 1000 mg/L d'antibiotique (Figure 3a) est nécessaire. Concernant les bactéries, une concentration minimale de 80 mg/L d'antifongique (pour les milieux TSA) semble nécessaire pour s'affranchir de la présence de colonies fongiques (résultats non montrés), confortant la concentration utilisée actuellement.

3.3 Etude de l'influence de la diminution du volume d'élution

Contrairement à ce qui avait pu être observé lors d'une étude menée sur les endotoxines, la diminution d'un volume d'élution de 10mL à 5mL ne semble avoir que peu d'influence sur l'élution et la quantification des micro-organismes. Ceci est d'autant plus important que ceci peut influencer les analyses qu'il est possible de réaliser par la suite sur le volume récupéré. En effet, un volume d'élution de 5 mL ne permet de récupérer qu'environ 3 mL de solution d'extraction contenant les microorganismes.

4. CONCLUSION

Les résultats expérimentaux obtenus lors des essais de laboratoire seront à valider sur le terrain sur des environnements complexes pour lesquels la diversité en termes de concentration et d'espèces microbiennes rencontrées donneront des résultats riches d'enseignement. Ceci permettra également de s'affranchir des éventuels biais associés à l'utilisation d'un seul milieu lors de la préparation des suspensions (TSB pour les bactéries ou MEA pour les moisissures). Des premières expérimentations de terrain ont déjà été réalisées sur plusieurs environnements de travail dont les résultats ne sont pas encore complètement exploités au moment de la rédaction de ce résumé. Par la suite, les différents milieux seront classés selon différents critères de performances telles que le dénombrement mais également l'aspect des colonies ou encore la solidité du milieu lors de l'étalement. L'objectif sera ainsi de proposer une méthode MétroPol plus complète en termes de données de validation, de fiabilité de la méthode et d'exhaustivité dans le choix des milieux à utiliser.

- Loison, P., L. Alonso, et P. Duquenne (2024) Evaluation et prévention des risques biologiques liés à l'exposition aux bioaérosols par inhalation. Hygiène et sécurité du travail. **277**: p. 41-45.
- MétroPol (2015), Microorganismes aérobies M-147. p. 8.
- Simon, X.; Loison, P. (2021) Airborne Fungi in Workplace Atmospheres: Overview of Active Sampling and Offline Analysis Methods Used in 2009–2019. In Encyclopedia of Mycology, 1st ed.; Zaragoza, O., Casadevall, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherland. Volume 2, pp. 49–58.
- Loison P, Alonso L, Simon X (2025). Optimization of the measurement method for airborne endotoxins in workplace atmospheres: experiments using laboratory-generated bioaerosols. Ann Work Expo Health. 2025 Sep 26;69(8):883-895. doi: 10.1093/annweh/wxaf057. PMID: 40916356.